

ANTICUERPOS ANTI-E-SELECTINA, COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/965.688, presentada el 24 de enero de 2020, la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 63/104.213 presentada el 22 de octubre de 2020, y la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 63/121.467 presentada el 4 de diciembre de 2020, cuyos contenidos se encuentran incorporados a la presente por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que fue presentado electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 6 de enero de 2021, de denomina PC072498A_Sequence_Listing_ST25.txt y tiene un tamaño de 1.048.576 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención se refiere a anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, que se fijan específicamente a E-selectina, y composiciones, métodos y usos de estos, incluso el uso de anticuerpos de la divulgación para tratar la enfermedad de células falciformes (SCD), que incluye el tratamiento y la prevención de la crisis vasooclusiva (VOC) asociada con SCD.

ANTECEDENTES

[0004] La enfermedad de células falciformes (SCD) es una enfermedad genética rara grave que afecta a más de 100.000 personas en Estados Unidos (EE. UU.) solamente (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades). Es una afección crónica con morbilidad y mortalidad sustanciales en una población con una gran necesidad médica insatisfecha. Los individuos con SCD padecen daño progresivo a los órganos y una esperanza de vida marcadamente acortada, con una mediana de supervivencia de aproximadamente 56 años (Gardner *et al.*, Blood 2016; 128(10)1436-38).

[0005] La SCD se caracteriza por la presencia de una forma anormal de hemoglobina (Hb), la hemoglobina falciforme (HbS). Una sustitución de un solo nucleótido en el gen de β -globina (HBB) da como resultado una sustitución de un aminoácido (valina por ácido glutámico) en el residuo 6 (alelo de HBS). Los individuos homocigotos en HBS tienen la forma más común y más grave de enfermedad de células falciformes (SCD-SS). Surgen formas variantes de SCD cuando un individuo tiene una copia de HBS y

una copia de una mutación en otro gen HBB. Los individuos con 1 copia del alelo de HBS y 1 copia del alelo de hemoglobina C (HBC) tienen la enfermedad de SC (SCD-SC). Cuando un individuo tiene una 1 copia de HBS y una copia de un alelo de β -talasemia, la gravedad de SCD depende de la gravedad del alelo de β -talasemia con eliminación de Hb β^0 -talasemia (SCD-S β^0 -thal) a menudo más grave que el alelo de Hb β^+ -talasemia (SCD-S β^+ -thal), u otra variante de HB interactiva (SCD-SVariant) (Frenett y Atweh J. Clin. Invest. 2007; 117:850-858).

[0006] El evento primario en la patogénesis molecular de SCD es la tendencia de HbS a polimerizarse en condiciones de baja tensión de oxígeno, lo que provoca que los glóbulos rojos (RBC) se vuelvan más rígidos y tengan forma falciforme (Fabry y Nagel Blood 1982; 60(6):1370-77). La hipoxia en el lecho venoso microcapilar produce inflamación del endotelio y adherencia de neutrófilos, y una disminución del rodamiento de neutrófilos y la velocidad de flujo. Estos agregados celulares quedan atrapados en la vasculatura mediante interacciones con células endoteliales. Las interacciones de adhesión de los RBC falciformes, leucocitos y células endoteliales obstruyen la vasculatura, lo que produce vasooclusión (Zhang *et al.*, Blood 2016;127:801-809; Okpala, 2006; Frenette y Atweh, J. Clin. Invest. 2007; 117:850-858). La homeóstasis desregulada de óxido nítrico contribuye a la disfunción vascular en SCD (Aslan y Freeman, 2007). Los agregados de células sanguíneas producen episodios de obstrucción vascular, infarto de órganos e isquemia, que se manifiestan clínicamente como episodios de dolor agudo. La anemia es el resultado de una vida acortada de los glóbulos rojos debido a la hemólisis y oclusión vascular que se precipita mediante interacciones entre el endotelio vascular y los RBC falciformes, leucocitos y plaquetas (Rees *et al.*, Lancet 2010; 376:2018-31).

[0007] La crisis vasooclusiva (VOC) es la manifestación clínica más común de SCD y es la principal causa de morbilidad en SCD, con interrupción del funcionamiento diario (Ballas y Lusardi, Am. J. Hematol. 2005; 79:17-25; Piel *et al.*, New Engl. J. Med. 2017; 376:1561-1573; Darbari *et al.*, PloS One 2013; 8(11):e79923). La VOC comienza por la interacción entre los RBC falciformes y el endotelio vascular en las vénulas poscapilares, donde la tensión de oxígeno está en su punto más bajo (Manwani y Frenette, Blood 2013; 122(24):3892-8). Esto produce daño endotelial que desencadena una respuesta inflamatoria y hace que los leucocitos, plaquetas y RBC adicionales sean reclutados al sitio de inflamación (Zhang *et al.*, Blood 2016; 127(7):801). Estos agregados celulares producen obstrucción vascular (Turhan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 2002; 99(5):3047-51) y ralentización del flujo sanguíneo en

vénulas poscapilares, lo que produce hipoxia tisular local y más inflamación tisular. Esto da como resultado más desoxigenación y falciformación de RBC, y propagación de la oclusión, a veces denominada reclutamiento secundario de células falciformes y vasos ocluidos (Stuart y Nagel, Lancet 2004; 364(9942):1343-60).

[0008] Las VOC pueden manifestarse en pacientes con SCD tan temprano como a los 6 meses de edad, aunque son considerablemente menos comunes en niños de corta edad que en niños más grandes o adultos (Benjamin *et al.*, Amer. Pain Soc. 1994; vol. 1, páginas 94). Aproximadamente 60 % de pacientes con SCD homocigota tienen al menos 1 episodio de VOC grave por año, pero una proporción de pacientes pueden tener más episodios (Platt *et al.*, N. Engl. J. Med. 1991; 325(1);11-6). En este mismo estudio, 5,2 % de los pacientes con genotipo de SCD tuvieron 3-10 episodios de VOC graves por año y una pequeña proporción (>1 %) de los pacientes tuvieron 10 o más episodios por año.

[0009] El dolor es la manifestación clínica de isquemia y oclusión vascular inicial y en curso (Ballas, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2005; 19(5):785-802), que puede ser particularmente agudo en pacientes con el genotipo SCD-SS, quienes, según se observó, también tienen una mortalidad más alta que otros genotipos (Platt *et al.*, N. Engl. J. Med. 1994; 330(23):1639-44).

[00010] El reclutamiento de leucocitos a áreas de daño endotelial vascular implica la familia de selectinas de moléculas de adhesión: E-selectina (también conocida como CD62E); P-selectina (también conocida como CD62P); y L-selectina (también conocida como CD62L), las cuales se regulan como parte de una respuesta inflamatoria (Ernst y Magnani Nat. Rev. Drug Discov. 2009; 8(8):661-77; Morikis *et al.*, Blood 2017; 130(19):2101-10). Si bien son similares en estructura, cada selectina exhibe una distribución, cinética de fijación al ligando y diversidad diferentes tanto en las funciones patológicas como en las fisiológicas.

[00011] La familia de selectinas de moléculas de adhesión y sus ligandos son parte de una respuesta proinflamatoria en SCD promovida por la alteración de los glóbulos rojos falciformes y las células endoteliales activadas. Las selectinas también cumplen una función crucial en la regulación del contacto inicial de la adhesión entre células, el rodamiento de leucocitos en el endotelio, la activación de integrina y la trans migración de células. La adhesión de leucocitos al endotelio inflamado y los agregados celulares circulantes son un evento característico en SCD.

[00012] La familia de selectinas de proteínas de fijación a carbohidratos comparten una estructura similar, en donde cada una tiene un dominio de

reconocimiento de carbohidratos en el terminal N característico de las lectinas dependientes de Ca^{2+} (tipo C), seguido de un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF), una serie de repeticiones de consenso cortas con homología con dominios reguladores del complemento, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta (McEver y Zhu, 2010). Las selectinas y sus ligandos median el reclutamiento de plaquetas y leucocitos de la sangre al endotelio vascular, lo que contribuye a la creación de un entorno proinflamatorio crónico.

[00013] La fisiopatología de SCD es compleja y heterogénea. Los síntomas incluyen crisis de dolor, anemia crónica, síndrome torácico agudo, apoplejía, secuestro esplénico, eventos o crisis de dolor agudo vasooclusivos, disfunción renal y susceptibilidad a infecciones bacterianas (Ashley-Koch *et al.*, Am. J. Epidemiol. 2000; 151:839-845; Steinberg, New Engl. J. Med. 1999; 340:1021-1030; Piel *et al.*, New Engl. J. Med. 2017; 376:1561-1573). Las complicaciones agudas en órganos vitales asociadas con SCD pueden incluir síndrome torácico agudo, apoplejía aguda, priapismo, complicaciones hepatobiliares, secuestro esplénico y disfunción renal aguda. Las complicaciones crónicas de la lesión acumulativa de SCD incluyen necrosis avascular, hipertensión pulmonar, complicaciones renales, complicaciones oftalmológicas, úlceras en las piernas y priapismo recurrente (Yawn *et al.*, JAMA 2014; 312:1033-48).

[00014] La hidroxiurea está aprobada para el tratamiento profiláctico de SCD. Mecánicamente, la hidroxiurea aumenta las concentraciones de hemoglobina fetal (HbF) y reduce la cantidad de crisis de dolor (Charache *et al.*, New Engl. J. Med. 1995; 332:1317-1322). Si bien la hidroxiurea se considera el tratamiento de referencia en la prevención de VOC, tiene una tasa de ineficacia de ~30-35 % y es ineficaz para tratar síntomas durante una VOC aguda. ENDARI (L-glutamina) se aprobó recientemente para el tratamiento profiláctico de SCD; sin embargo, el mecanismo de acción no está claro y el beneficio clínico es modesto (Quinn, Blood 2018; 132:689-693). Los tratamientos para episodios de VOC aguda son principalmente complementarios con analgésicos opioides, hidratación, oxígeno y transfusión. Además, la mayoría de los pacientes tratan una VOC en su hogar y no solicitan intervención médica directa (Smith *et al.*, Ann. Intern. Med. 2008; 148:94-101; Callaghan *et al.*, Blood 2017; 130:973).

[00015] Sigue existiendo una necesidad significativa de profilaxis y tratamiento de SCD y, en particular, de abordar la fisiopatología subyacente (por ejemplo, reducción de la inflamación y agregación celular) de VOC recidivante y debilitante en

pacientes. La presente invención proporciona anticuerpos terapéuticos novedosos que se fijan específicamente a E-selectina y son capaces de neutralizar la actividad funcional de E-selectina. Estos anticuerpos se pueden usar ventajosamente para prevenir o reducir los casos de VOC cuando se utilizan como un tratamiento profiláctico contra la SCD, y para tratar una VOC aguda en pacientes con SCD al disminuir la duración (por ejemplo, una reducción en el tiempo para resolver una VOC), intensidad y/o gravedad de la VOC.

SÍNTESIS

[00016] La invención proporciona anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, que se fijan específicamente a E-selectina, así como usos y métodos asociados. Las personas del oficio de nivel medio reconocerán, o podrán determinar sin más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descritas en la presente. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes formas de realización (E).

E1. Un anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina (por ejemplo, E-selectina humana y/o de *Macaca fascicularis*).

E2. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con E1, que comprende las secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 23, 52, 63, 77, 92, 111, 125, 9, 24, 29, 38, 41, 44, 53, 64, 78, 93, 112, 126, 10, 54, 65, 79, 94, 113 y 127.

E3. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E2, que comprende las secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 18, 47, 68, 82, 97, 106, 9, 24, 29, 38, 41, 44, 53, 64, 78, 93, 112, 126 10, 54, 65, 79, 94, 113 y 127.

E4. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E3, que comprende una o más de (a)-(f)

- (a) una secuencia de aminoácidos de LCDR-1 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2, 18, 47, 68, 82, 97 y 106;
- (b) una secuencia de aminoácidos de LCDR-2 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 3, 19, 48, 69, 83, 98, 107 y 120;
- (c) una secuencia de aminoácidos de LCDR-3 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4, 20, 49, 70, 84, 99, 108 y 121;

- (d) una secuencia de aminoácidos de HCDR-1 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8, 23, 52, 63, 77, 92, 111 y 125;
- (e) una secuencia de aminoácidos de HCDR-2 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 9, 24, 29, 38, 41, 44, 53, 64, 78, 93, 112 y 126; y
- (f) una secuencia de aminoácidos de HCDR-3 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10, 54, 65, 79, 94, 113 y 127.

E5. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E4, que comprende una o más de las siguientes:

- una LCDR-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,
- una LCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,
- una LCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4,
- una HCDR-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8,
- una HCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y
- una HCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

E6. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E5, que comprende las secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128.

E7. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E6, que comprende las secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122.

E8. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E7, que comprende las secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 13, 22, 28, 34, 37, 40, 43, 51, 59, 62, 74, 76, 89, 91, 103, 110, 117 y 124.

E9. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E8, que comprende las secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 17, 26, 31, 46, 56, 67, 72, 81, 86, 96, 101, 105, 115 y 119.

E10. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E9, que comprende las secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de SEQ ID NO: 11.

E11. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E10, que comprende las secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de SEQ ID NO: 5.

E12. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E11, que comprende las secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de SEQ ID NO: 7 o 13.

E13. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E12, que comprende las secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de SEQ ID NO: 1.

E14. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E13, que comprende una LCDR-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una LCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, una LCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HCDR-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una HCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una HCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

E15. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E4, que comprende una LCDR-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una LCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una LCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

E16. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E15, que comprende una HCDR-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una HCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una HCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

E17. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E16, que comprende una secuencia de marco VL derivada de una secuencia VL de la línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en IGKV1-12*01, IGKV1-13*02, IGKV1-33*01, IGKV1-39*01, IGKV1-5*01, IGKV3-11*01, IGKV3-15*01, IGKV3-20*01, IGKV3D-20*02 e IGKV4-1*01.

E18. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E17, que comprende una secuencia de marco VH derivada de una secuencia VH de la línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en

IGHV1-2*02, IGHV1-3*01, IGHV1-46*01, IGHV1-69*01, IGHV1-69*02, IGHV1-8*01, IGHV3-7*01, IGHV3-13*01, IGHV3-23*01, IGHV3-23*04, IGHV3-30*01, IGHV3-30*18, IGHV5-10-1*01, IGHV5-10-1*04 e IGHV5-51*01.

E19. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E18, que comprende una secuencia de marco VL de IGHV1-39*01.

E20. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E19, que comprende una secuencia de marco VH de IGHV3-07*01.

E21. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E20, que comprende una secuencia de marco VL y una secuencia de marco VH, y en donde la secuencia de marco VL es al menos 72 % idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que derivó.

E22. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E21, que comprende una secuencia de marco VL y una secuencia de marco VH, y en donde la secuencia de marco VL es al menos 72 %, 74 %, 75 %, 77 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que derivó.

E23. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E22, que comprende una secuencia de marco VL y una secuencia de marco VH, y en donde la secuencia de marco VH es al menos 53 % idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que derivó.

E24. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E23, que comprende una secuencia de marco VL y una secuencia de marco VH, y en donde la secuencia de marco VH es al menos 53 %, 58 %, 60 %, 63 %, 71 %, 72 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de línea germinal humana de la que derivó.

E25. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E24, que comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 11.

E26. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E25, que comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 11.

E27. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E26, que comprende un dominio VH que comprende, o que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

- E28. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E27, que comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 5.
- E29. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E28, que comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 5.
- E30. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E29, que comprende, o que consiste en, un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- E31. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E30, que comprende un dominio VH que comprende, o que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende, o que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- E32. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E31, que comprende un dominio Fc.
- E33. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con E32, en donde el dominio Fc es el dominio Fc de una IgA (por ejemplo, IgA₁ o IgA₂), IgD, IgE, IgM o IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄).
- E34. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con E33, en donde el dominio Fc es el dominio Fc de una IgG.
- E35. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con E34, en donde la IgG se selecciona del grupo que consiste en IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄.
- E36. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con E35, en donde la IgG es IgG₁.
- E37. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E36, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13.
- E38. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E37, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13.
- E39. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E38, que comprende una cadena pesada que comprende, o que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13.

E40. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E39, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 22, 28, 34, 37, 40, 43, 51, 59, 62, 74, 76, 89, 91, 103, 110, 117 y 124.

E41. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E40, que comprende una LC que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1.

E42. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E41, que comprende una LC que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1.

E43. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E42, que comprende una LC que comprende, o que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

E44. Un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E43, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

E45. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E45, que comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 17, 26, 31, 1, 46, 56, 67, 72, 81, 86, 96, 101, 105, 115 y 119.

E46. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E45, que comprende las HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 codificadas por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126529.

E47. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E46, que comprende las LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 codificadas por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126530.

E48. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E47, que comprende un dominio VH codificado por el inserto en el plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126529.

- E49. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E48, que comprende un dominio VL codificado por el inserto en el plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126530.
- E50. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E49, que comprende la secuencia de aminoácidos de HC codificada por el inserto en el plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126529 y la secuencia de aminoácidos de LC codificada por el inserto en el plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126530.
- E51. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E50, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno es una proteína de fusión Fc, un monocuerpo, un maxicuerpo, un anticuerpo bifuncional, un scFab, un scFv o un peptidocuerpo.
- E52. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E52, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina humana con una K_D de alrededor de o menor que un valor seleccionado del grupo que consiste en alrededor de 800 nM, 700 nM, 600 nM, 500 nM, 400 nM, 300 nM, 200 nM, 175 nM, 150 nM, 125 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM y 500 pM.
- E53. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E52, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina de *Macaca fascicularis* con una K_D de alrededor de o menor que un valor seleccionado del grupo que consiste en alrededor de 800 nM, 700 nM, 600 nM, 500 nM, 400 nM, 300 nM, 200 nM, 175 nM, 150 nM, 125 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM y 500 pM.
- E54. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E53, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina humana con una K_D de alrededor de 10 nM a alrededor de 200 nM.
- E55. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E54, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina humana con una K_D de alrededor de 68,4 +/- 3,18 nM.
- E56. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E55, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de

este, se fija a E-selectina de *Macaca fascicularis* con una K_D de alrededor de 10 nM a alrededor de 200 nM.

E57. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E56, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina de *Macaca fascicularis* con una K_D de alrededor de 64,9 +/- 1,13 nM.

E58. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E57, en donde el anticuerpo anti-E-selectina se fija a E-selectina humana con una K_D seleccionada del grupo que consiste en alrededor de 92,85 nM, alrededor de 70,3 nM, alrededor de 65,2 nM, alrededor de 61,8 nM, alrededor de 60,5 nM, alrededor de 68,0 nM, alrededor de 21,6 nM, alrededor de 324 nM, alrededor de 54,4 nM, alrededor de 628,5 nM y 2940 nM.

E59. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E58, en donde el anticuerpo anti-E-selectina se fija a E-selectina de *Macaca fascicularis* con una K_D seleccionada del grupo de alrededor de 138,5 nM, alrededor de 78,3 nM, alrededor de 76,5 nM, alrededor de 81,5 nM, alrededor de 67,8 nM, alrededor de 45,8 nM, alrededor de 243,5 nM, alrededor de 45,4 nM, alrededor de 492 nM y 3145 nM.

E60. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E59, en donde la media de semivida en *Macaca fascicularis* es de al menos alrededor de 14,4 días (345 horas) tras la administración IV a una dosis de 10 mg/kg.

E61. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E60, en donde la media de semivida en *Macaca fascicularis* es de al menos alrededor de 12 días (287 horas) tras la administración IV a una dosis de 3 mg/kg.

E62. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E61, en donde la media de semivida en *Macaca fascicularis* es de alrededor de 21,5 días (518 horas) tras la administración SC a una dosis de 3 mg/kg.

E63. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E62, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, no incluye anticuerpos antifármaco.

E64. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E63, en donde el potencial inmunogénico previsto del anticuerpo, como lo indica la puntuación ajustada en función de T-regítapos (T-Reg), es menor de

alrededor de -30.

E65. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E64, en donde el potencial inmunogénico previsto del anticuerpo, como lo indica la puntuación ajustada en función de T-regítapos (T-Reg), es menor de alrededor de -45 y no hay epítomos de linfocitos T no germinales.

E66. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E65, en donde el potencial inmunogénico previsto del anticuerpo, como lo indica la puntuación ajustada en función de T-Reg, es menor que la puntuación ajustada en función de T-Reg seleccionada del grupo que consiste en alrededor de -24, -26, -27, -30, -32, -33, -34, -35, -36, -37, -38, -39, -40, -41, -42, -43, -44, -45, -46, -47 y -48.

E67. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E66, en donde el potencial inmunogénico previsto del anticuerpo, como lo indica la puntuación ajustada en función de T-Reg, es de alrededor de -45 o -46.

E68. El anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E67, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene bajo riesgo de polirreactividad, según se mide, por ejemplo, mediante un ensayo AC-SINS, un ensayo de fijación a ADN y/o un ensayo de fijación a insulina.

E69. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E68, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno tiene una viscosidad seleccionada del grupo que consiste en alrededor de 7,97 +/- 1,83 cP a una concentración de alrededor de 23 mg/ml, alrededor de 12,38 +/- 5,28 cP a una concentración de alrededor de 48 mg/ml, alrededor de 4,26 +/- 0,6 cP a una concentración de alrededor de 90 mg/ml, alrededor de 5,58 +/- 0,99 cP a una concentración de alrededor de 102 mg/ml, alrededor de 8,44 +/- 1,54 cP a una concentración de alrededor de 121 mg/ml, alrededor de 9,78 +/- 2,32 cP a una concentración de alrededor de 140 mg/ml, alrededor de 17,47 +/- 3,24 cP a una concentración de alrededor de 158 mg/ml y alrededor de 37,99 +/- 7,03 cP a una concentración de alrededor de 188 mg/ml, cuando se mide a 25 °C mediante, por ejemplo, dispersión de luz dinámica (DLS).

E70. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E69, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno tiene una viscosidad de alrededor de 15 cP a 40 cP a una concentración de alrededor de

150 mg/ml a alrededor de 190 mg/ml cuando se mide a 25 °C mediante, por ejemplo, DLS.

E71. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E70, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno tiene una viscosidad de 33,4 cP a 185,7 mg/ml cuando se mide a 25 °C mediante, por ejemplo, un método Anton Paar.

E72. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E71, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos uno de los tres epítomos de E-selectina humana según se determina mediante, por ejemplo, un ensayo de competencia con, por ejemplo, un biosensor Octet.

E73. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con E72, en donde al menos 2 de los epítomos se superponen.

E74. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E73, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un residuo de aminoácido de E-selectina humana seleccionado del grupo que consiste en T7, E8, A9, M10, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, N105, E107, R108, S110, K111, K112, K113, y una combinación de estos.

E75. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E74, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un residuo de aminoácido de E-selectina humana dentro de 3,8 Å seleccionado del grupo que consiste en T7, E8, A9, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E92, Y94, N105, E107, R108, S110, K111, K112 y una combinación de estos.

E76. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E75, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un residuo de aminoácido de E-selectina humana con un área de superficie enterrada (Å²) de >5 Å² seleccionado del grupo que consiste en T7, E8, A9, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, E107, R108, S110, K111, K112, K113 y una combinación de estos.

E77. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E76, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un residuo de aminoácido de E-selectina humana a través de un enlace de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en E8, S47,

N82, N83, E88, E92, Y94, N105, E107, R108, S110, K112, y una combinación de estos.

E78. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E77, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un residuo de aminoácido de E-selectina humana a través de un puente salino seleccionado del grupo que consiste en K111, K112 y una combinación de estos.

E79. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E78, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un residuo de aminoácido de E-selectina humana a través de un enlace de hidrógeno mediado por agua seleccionado del grupo que consiste en R97, K112 y una combinación de estos.

E80. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E79, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un residuo de aminoácido de E-selectina humana que también interactúa dentro de 3,8Å de un residuo de aminoácido sLex seleccionado del grupo que consiste en Y48, N82, N83, E92, Y94, R97, N105, E107 y una combinación de estos.

E81. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E80, en donde el porcentaje de HMMS y/o el porcentaje de LMMS es menor de 5 % tras el almacenamiento a 40 °C durante 4 semanas en una solución seleccionada del grupo que consiste en Tris 20 mM a pH 7,5, histidina 20 mM a pH 5,8 y ácido glutámico 20 mM a pH 4,5, y en donde, opcionalmente, el análisis se realiza mediante aSEC.

E82. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E81, en donde el porcentaje de HMMS es menor de 5 % tras el almacenamiento a 4 °C o 25 °C por hasta 6 semanas en una solución seleccionada del grupo que consiste en Tris 20 mM, sacarosa al 8,5 % a pH 7,5, histidina 20 mM, sacarosa al 8,5 %, EDTA al 0,005 % a pH 5,8 y ácido glutámico 20 mM, trehalosa al 8,5 % a pH 4,5; en donde el anticuerpo está a una concentración de alrededor de 150 mg/ml; y en donde, opcionalmente, el análisis se realiza mediante aSEC.

E83. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E82, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m1), o la temperatura a la que el C_{H2} del anticuerpo está 50 % desplegado, de alrededor de

65 °C o más, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E84. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E83, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m1), o la temperatura a la que el C_H2 del anticuerpo está 50 % desplegado, de entre 65 °C y 72 °C, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E85. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E84, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m1), o la temperatura a la que el C_H2 del anticuerpo está 50 % desplegado, de alrededor de 71,7 °C, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E86. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E85, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m2), o la temperatura a la que el Fab del anticuerpo está 50 % desplegado, de alrededor de 74 °C o más, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E87. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E86, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m2), o la temperatura a la que el Fab del anticuerpo está 50 % desplegado, de entre 74 °C y 78 °C, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E88. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E87, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m2), o la temperatura a la que el Fab del anticuerpo está 50 % desplegado, de alrededor de 78,2 °C, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E89. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E88, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m3), o la temperatura a la que el C_H3 del anticuerpo está 50 % desplegado, de alrededor de 82 °C o más, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E90. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E89, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m3), o la temperatura a la que el C_H3 del anticuerpo está 50 % desplegado, de entre 82 °C y

86 °C, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E91. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E90, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una estabilidad térmica con una temperatura de fusión (T_m), o la temperatura a la que el C_H3 del anticuerpo está 50 % desplegado, de alrededor de 84,3 °C, según se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

E92. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E91, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la E-selectina humana expresada en la superficie celular, que es menor o igual a 50 nM, por ejemplo, menor o igual a 48 nM, 45 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,75 nM, 0,5 nM, 0,25 nM o 0,1 nM, según se mide, por ejemplo, mediante FACS.

E93. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E92, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la E-selectina humana expresada en la superficie celular, de alrededor de 0,66 nM, según se mide, por ejemplo, mediante FACS.

E94. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E93, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular, que es menor o igual a 50 nM, por ejemplo, menor o igual a 48 nM, 45 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,75 nM, 0,5 nM, 0,25 nM o 0,1 nM, según se mide, por ejemplo, mediante FACS.

E95. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E94, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la P-selectina humana expresada en la superficie celular, que es mayor o igual a 350 nM, por ejemplo, mayor o igual a 400 nM, 450 nM, 500 nM, 550 nM, 600 nM, 650 nM o más, según se mide, por ejemplo, mediante FACS.

E96. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E95, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una fijación débil, o ninguna en absoluto, a la E-selectina de rata, ratón o conejo soluble o a la L- o P-selectina humana soluble.

E97. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con

cualquiera de E1-E96, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una fijación débil, o ninguna en absoluto, a la P-selectina humana expresada en la superficie celular.

E98. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E97, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, no demuestra fijación a la E-selectina de rata, ratón o conejo o a la L- o P-selectina humana soluble en hasta 405 nM según se mide, por ejemplo, mediante SPR.

E99. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E98, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, demuestra una fijación débil-no saturable a la E-selectina de ratón o rata soluble que es alrededor de >100 x menor que la fijación a la E-selectina humana o de rata según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de fijación directa.

E100. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E99, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, demuestra una fijación débil-no saturable a la E-selectina de ratón o rata soluble en hasta 133,3 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de fijación directa.

E101. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E100, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina humana soluble con una EC_{50} menor o igual a 2 nM, por ejemplo, menor o igual a 0,010 nM, 0,015 nM, 0,020 nM, 0,025 nM, 0,030 nM, 0,035 nM, 0,040 nM, 0,045 nM, 0,05 nM, 0,055 nM, 0,06 nM, 0,065 nM, 0,070 nM, 0,075 nM, 0,080 nM, 0,085 nM, 0,090 nM, 0,10 nM, 0,12 nM, 0,15 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 0,9 nM, 0,95 nM, 1,0 nM, 1,5 nM, 18 nM o 1,9 nM.

E102. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E101, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina humana soluble con una EC_{50} de alrededor de 0,085 nM a alrededor de 0,12 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de fijación directa.

E103. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E102, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una EC_{50} menor o igual a 1 nM, por ejemplo, menor o igual a 0,010 nM, 0,015 nM, 0,020 nM, 0,025 nM, 0,030 nM, 0,035 nM, 0,040 nM, 0,045 nM, 0,05 nM, 0,055 nM, 0,06 nM, 0,065 nM, 0,070 nM, 0,075 nM, 0,080 nM, 0,085 nM, 0,090 nM, 0,10 nM, 0,12 nM, 0,15 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 0,9 nM o 0,95 nM.

E104. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E103, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una EC_{50} de 0,071 nM a 0,093 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de fijación directa.

E105. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E104, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina humana soluble libre en suero humano con una IC_{50} de alrededor de 1 nM a alrededor de 3 nM, y preferentemente con una IC_{50} de alrededor de 1,2 nM.

E106. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E105, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana soluble con una IC_{50} menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E107. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E106, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana soluble con una IC_{50} de alrededor de 2,87 nM a alrededor de 3,01 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E108. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E107, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una IC_{50} menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E109. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E108, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una IC_{50} de alrededor de 2,39 nM a alrededor de 2,91 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E110. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con

cualquiera de E1-E109, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E111. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E110, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 1,88 nM a alrededor de 2,89 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E112. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E111, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E113. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E112, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 1,47 nM a alrededor de 2,65 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

E114. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E113, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones estáticas.

E115. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E114, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de

este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 3,36 nM a alrededor de 4,7 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones estáticas.

E116. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con E1-E115, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 3,84 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones estáticas.

E117. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E116, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM o 2 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E118. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E117, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 4,25 nM a alrededor de 4,56 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E119. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E118, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 4,32 nM a alrededor de 4,35 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E120. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E119, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina

humana soluble con una IC₅₀ menor o igual a 300 nM, por ejemplo, menor o igual a 290 nM, 280 nM, 270 nM, 260 nM, 250 nM, 150 nM, 100 nM, 90 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 20 nM, 5 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E121. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E120, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ de alrededor de 13,28 nM a alrededor de 15,94 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E122. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E121, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de neutrófilos humanos activados (por ejemplo, TNF- α activado) a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 9,45 nM a alrededor de 16,33 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E123. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E122, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de neutrófilos humanos activados (por ejemplo, TNF- α activado) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 2,87 nM a alrededor de 4,65 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E124. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E123, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células sanguíneas de pacientes con SCD a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ de alrededor de 6,17 nM a alrededor de 18,66 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E125. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E124, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células sanguíneas de pacientes con SCD a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ de alrededor de 12,4 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

E126. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125.

E127. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125.

E128. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una VL, VH, o ambas, de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 136, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 137 o ambas.

E129. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o que consiste en, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 136, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 137 o ambas.

E130. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o que consiste en, la secuencia de ácidos nucleicos que se establece como SEQ ID NO: 136.

E131. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o que consiste en, la secuencia de ácidos nucleicos que se establece como SEQ ID NO: 137.

E132. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la VH de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 136, 144, 146, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171 y 173.

E133. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la VH de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende un ácido nucleico al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 136, 144, 146, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171 y 173.

E134. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la VL de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 137, 145, 147, 149, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172 y 174.

E135. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la VL de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende un ácido nucleico al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a una secuencia de ácidos nucleicos

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 137, 145, 147, 149, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172 y 174.

E136. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una cadena liviana, una cadena pesada o ambas, de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 206 o 138; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 139; o ambas.

E137. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o que consiste en, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 206 o 138; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 139; o ambas.

E138. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o que consiste en, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 206 o 138.

E139. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o que consiste en, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 139.

E140. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529.

E141. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530.

E142. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, en donde dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529 y la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530.

E143. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529.

E144. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso

PTA-126530.

E145. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529 y la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530.

E146. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de E126-E145.

E147. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de E126-E145, o el vector de acuerdo con E146.

E148. La célula huésped de acuerdo con E147, en donde dicha célula es una célula de mamífero.

E149. La célula huésped de acuerdo con E147 o E148, en donde dicha célula huésped es una célula CHO, una célula HEK-293, una célula NS0, una célula PER.C6® o una célula Sp2.0.

E150. Un método para elaborar un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con cualquiera de E147-E149, en una condición en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno es expresado por dicha célula huésped.

E151. El método de acuerdo con E150, que comprende además aislar dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este.

E152. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de E1-E125 y E221, y un portador o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

E153. La composición farmacéutica de acuerdo con E152, en donde la composición comprende 1,12 mg/ml de L-histidina, 2,67 mg/ml de L-histidina clorhidrato monohidrato, 85 mg/ml de sacarosa, 0,05 mg/ml de edetato disódico dihidrato y 0,2 mg/ml de polisorbato 80 a pH 5,8.

E154. La composición farmacéutica de acuerdo con E152 o E153, en donde la composición comprende histidina 20 mM, 8,5 % de sacarosa, y 0,02 % de polisorbato 80, 0,005 % de EDTA a pH 5,8.

E155. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E154, en donde la composición comprende alrededor de 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml de anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este.

E156. La composición farmacéutica de acuerdo con E155, en donde la composición

comprende alrededor de 100 mg/ml de anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este.

E157. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E156, en donde la dosis es una dosis de 1 ml.

E158. La composición farmacéutica de acuerdo con E152-E157, en donde la composición es adecuada para la administración SC y/o IV.

E159. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E158, que comprende un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende i) secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de SEQ ID NO: 11 y secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de SEQ ID NO: 5; ii) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; o iii) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

E160. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E159, que comprende un compuesto terapéuticamente activo adicional seleccionado del grupo que consiste en L-glutamina (por ejemplo, ENDARI), un anticuerpo anti-P-selectina (por ejemplo, crizanlizumab (ADAKVEO)), un compuesto que modula HbS para mantenerla en su estado R (es decir, oxigenado), por ejemplo, una 2-aminoquinolina y aquellos descritos en WO 2020/109994 (incorporada en la presente por referencia), un compuesto que modula la afinidad al oxígeno de HbS (por ejemplo, voxelotor (OXBRYTA)), un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al modular la generación de ácido 2,3-difosfoglicérico, un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al inducir la expresión de hemoglobina fetal (por ejemplo, hidroxiurea, por ejemplo, DROXIA, HYDREA), un compuesto que se dirige a la adhesión celular disfuncional, la disfunción vascular y/o la inflamación (por ejemplo, un inhibidor de fosfodiesterasa-9), un compuesto que aumenta los niveles de óxido nítrico en la sangre (por ejemplo, un estimulador de guanilato ciclasa soluble, por ejemplo, IW-1701, riociguat (ADEMPAS)), IG intravenosa, un compuesto que se dirige a la hipercoagulabilidad (por ejemplo, riociguat (ADEMPAS), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO)), un compuesto que bloquea la fijación al receptor NMDA (por ejemplo, memantina (NAMENDA)) y una combinación de estos.

E161. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E159, que comprende un compuesto terapéuticamente activo adicional seleccionado del grupo que consiste en profilaxis de penicilina para prevenir la infección por neumococo,

hidroxiurea (por ejemplo, DROXIA, HYDREA), L-glutamina (por ejemplo, ENDARI), crizanlizumab (ADAKVEO), voxelotor (OXBRYTA), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico, generalmente un analgésico opioide, IW-1701, riociguat (ADEMPAS), ticagrelor (BRILINTA), memantina (NAMENDA) y una combinación de estos.

E162. Un método para reducir o inhibir la actividad de la E-selectina, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125, E221, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161, y comparar la actividad de la E-selectina antes de la administración con el nivel de actividad de la E-selectina después de la administración del anticuerpo, por lo que se reduce la actividad de la E-selectina.

E163. El método de acuerdo con E162, en donde reducir o inhibir la actividad de la E-selectina trata una enfermedad, trastorno o afección que se mejora, alivia, inhibe o previene mediante la eliminación, inhibición o reducción de la actividad de la E-selectina.

E164. El método de acuerdo con cualquiera de E162-E163, en donde la actividad de la E-selectina se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) unión de leucocitos a células endoteliales;
- (b) activación de adhesión estable a células endoteliales;
- (c) rodamiento lento de leucocitos hasta detenerse;
- (d) migración transendotelial eficiente de leucocitos;
- (e) afinidad y avidéz de integrinas CD18;
- (f) tráfico de leucocitos a sitios de inflamación aguda;
- (g) aumento de calcio citosólico;
- (h) aumento de la fosforilación de tirosina que activa p38 MAP quinasa y Syk quinasa;
- (i) reclutamiento de plaquetas y leucocitos de la sangre al endotelio vascular; y
- (j) creación de un entorno proinflamatorio.

E165. Un método para reducir el nivel de E-selectina libre en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161.

E166. Un método para tratar y/o prevenir una enfermedad, trastorno y/o afección

asociado con, o mediado por, la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a un ligando, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161.

E167. El método de acuerdo con E166, en donde la enfermedad, trastorno y/o afección es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en SCD, crisis vasooclusiva (VOC), dolor, infarto de órganos, isquemia, apoplejía y disfunción de órganos vitales, síndrome torácico agudo y obstrucción vascular, enfermedades de la piel (por ejemplo, psoriasis), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide) y complicaciones de la diabetes.

E168. El método de acuerdo con cualquiera de E167, en donde la VOC está asociada con SCD.

E169. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E168, que comprende un tratamiento profiláctico contra la SCD mediante la prevención o reducción de los casos de VOC.

E170. El método de acuerdo con cualquiera de E167-E169, que comprende un tratamiento agudo contra la SCD mediante la disminución de la duración (por ejemplo, reducción en el tiempo para resolver una VOC) e intensidad de una VOC.

E171. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E170, en donde el tratamiento es un tratamiento profiláctico.

E172. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E171, que trata, previene y/o mejora al menos un signo y/o síntoma de SCD, por ejemplo, los que afectan el sistema cardiorrespiratorio (por ejemplo, enfermedad pulmonar restrictiva crónica, enfermedad diastólica del ventrículo izquierdo, hipertensión pulmonar, síndrome torácico agudo, arritmias, muerte súbita, crisis vasooclusiva), el sistema nervioso (por ejemplo, accidente cerebrovascular hemorrágico, trombosis del seno venoso, infarto cerebral silencioso del cerebro, dolor crónico, accidente cerebrovascular isquémico agudo del cerebro, retinopatía proliferativa, infarto orbitario, deterioro cognitivo) el sistema reticuloendotelial (por ejemplo, secuestro esplénico, hipoesplenismo funcional, anemia, hemólisis), el sistema musculoesquelético (por ejemplo, necrosis avascular, ulceraciones cutáneas), el sistema urogenital (por ejemplo, necrosis papilar, proteinuria, insuficiencia renal, hematuria, enuresis nocturna, priapismo) y el sistema gastrointestinal (por ejemplo, colelitiasis, colangiopatía, hepatopatía, vasooclusión mesentérica).

E173. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E172, en donde el sujeto es un ser humano.

E174. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E173, en donde el sujeto es un paciente con SCD.

E175. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E174, en donde el sujeto tiene un genotipo variante de HBSS, HBSC, HBS/ β° thal, HBS/ β^{+} thal o HBS.

E176. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E175, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, se administra por vía subcutánea.

E177. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E176, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, se administra por vía intravenosa.

E178. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E177, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, se administra alrededor de dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, dos veces por mes, una vez por mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses o una vez cada doce meses.

E179. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E177, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, se administra una vez por mes.

E180. El método de acuerdo con cualquiera de E166-E179, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, se administra una vez por semana.

E181. El método de acuerdo con cualquiera de E66-E180, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 800 mg del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este.

E182. El método de acuerdo con E181, en donde la dosis es una dosis fija inicial.

E183. El método de acuerdo con cualquiera de E181-E182, en donde la dosis es de alrededor de 1 mg a alrededor de 10 mg, de alrededor de 10 mg a alrededor de 20 mg, de alrededor de 20 mg a alrededor de 30 mg, de alrededor de 30 mg a alrededor de 40

mg, de alrededor de 40 mg a alrededor de 50 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 60 mg, de alrededor de 60 mg a alrededor de 70 mg, de alrededor de 70 mg a alrededor de 80 mg, de alrededor de 80 mg a alrededor de 90 mg, de alrededor de 90 mg a alrededor de 100 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 150 mg, de alrededor de 150 mg a alrededor de 200 mg, de alrededor de 200 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 300 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 600 mg a alrededor de 700 mg o de alrededor de 700 mg a alrededor de 800 mg del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este.

E184. El método de acuerdo con cualquiera de E181-E183, en donde la dosis es de alrededor de 15 mg, 40 mg, 100 mg, 150 mg, 300 mg, 500 mg o 600 mg de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este.

E185. El método de acuerdo con cualquiera de E181-E184, en donde la dosis es de alrededor de 150 mg del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este.

E186. El método de acuerdo con cualquiera de E81-E185, que comprende administrar la dosis una vez por semana, una vez cada 2 semanas, una vez por mes, una vez cada dos meses o una combinación de estos.

E187. El método de acuerdo con cualquiera de E162-E186, en donde el anticuerpo es el anticuerpo 1444 y el fragmento de fijación al antígeno es un fragmento del anticuerpo 1444.

E188. El método de acuerdo con cualquiera de E162-E187, en donde la administración es administración subcutánea o intravenosa.

E189. El método de acuerdo con cualquiera de E162-E188, que comprende administrar un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende i) secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de SEQ ID NO: 11 y secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de SEQ ID NO: 5; ii) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; o iii) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

E190. Un método de acuerdo con cualquiera de E162-E188, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende i) secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de SEQ ID NO: 11 y secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de SEQ ID

NO: 5; ii) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; o iii) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

E191. El método de acuerdo con cualquiera de E162-E190, en donde el sujeto es un paciente con SCD.

E192. Un método para tratar SCD, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende i) secuencias de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 de SEQ ID NO: 11 y secuencias de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 de SEQ ID NO: 5; ii) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; o iii) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un portador o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

E193. El método de acuerdo con E192, en donde tratar la SCD incluye tratar al menos un síntoma de SCD, que incluye VOC.

E194. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E193, en donde el sujeto es un paciente con SCD.

E195. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E194, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este por vía subcutánea y/o intravenosa.

E196. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E195, en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este se administra alrededor de dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, dos veces por mes, una vez por mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses o una vez cada doce meses.

E197. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E196, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, se administra una vez por semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez por

mes o una combinación de estos.

E198. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E197, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este se administra a una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 800 mg.

E199. El método de acuerdo con cualquiera de E192-198, en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, se administra a una dosis seleccionada del grupo que consiste en alrededor de 15 mg, alrededor de 40 mg, alrededor de 100 mg, alrededor de 150 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 500 mg y alrededor de 600 mg.

E200. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E199, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se administra en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos o modalidades de tratamiento terapéuticamente activos adicionales eficaces para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD.

E201. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E200, en donde la cantidad del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, y la cantidad del compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD se administran en cantidades que, en conjunto, logran efectos sinérgicos en el tratamiento y/o la prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD.

E202. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E201, en donde cada una de la cantidad del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, y/o la cantidad del compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD se administra a una dosis que es menor que la que se administraría si no estuvieran en combinación.

E203. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E202, en donde el compuesto terapéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en profilaxis de penicilina para prevenir la infección por neumococo, hidroxiurea (por ejemplo, DROXIA, HYDREA), L-glutamina (por ejemplo, ENDARI), crizanlizumab (ADAKVEO), voxelotor (OXBRYTA), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico, generalmente un analgésico opioide, IW-1701, riociguat (ADEMPAS), ticagrelor (BRILINTA), memantina (NAMENDA) y una combinación de estos.

E204. El método de acuerdo con cualquiera de E192-E203, en donde el compuesto terapéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en L-glutamina

(por ejemplo, ENDARI), un anticuerpo anti-P-selectina (por ejemplo, crizanlizumab (ADAKVEO)), un compuesto que modula HbS para mantenerla en su estado R (es decir, oxigenado), por ejemplo, una 2-aminoquinolina y aquellos descritos en WO 2020/109994 (incorporada en la presente por referencia), un compuesto que modula la afinidad al oxígeno de HbS (por ejemplo, voxelotor (OXBRYTA)), un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al modular la generación de ácido 2,3-difosfoglicérico, un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al inducir la expresión de hemoglobina fetal (HbF) (por ejemplo, hidroxiaurea, por ejemplo, DROXIA, HYDREA), un compuesto que se dirige a la adhesión celular disfuncional, la disfunción vascular y/o la inflamación (por ejemplo, inhibidores de fosfodiesterasa-9), un compuesto que aumenta los niveles de óxido nítrico en la sangre (por ejemplo, estimuladores de guanilato ciclasa soluble, por ejemplo, IW-1701, riociguat (ADEMPAS)), IG intravenosa, un compuesto que se dirige a la hipercoagulabilidad (por ejemplo, riociguat (ADEMPAS), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO)), un compuesto que bloquea la fijación al receptor NMDA (por ejemplo, memantina (NAMENDA)) y una combinación de estos.

E205. El método de acuerdo con cualquiera de E192-204, en donde la modalidad de tratamiento terapéuticamente activo útil para el tratamiento y/o la prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD se selecciona del grupo que consiste en suplemento de oxígeno, transfusión de sangre, opcionalmente con quelación de hierro, trasplante de médula ósea, tratamiento génico (por ejemplo, LentiGlobin®), un tratamiento de edición de genes mediante CRISPR (por ejemplo, CTX001) o una técnica de dedos de zinc y una combinación de estos.

E206. El método de acuerdo con cualquiera de E200-E205, en donde se coadministran el anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, y el compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD.

E207. El método de acuerdo con cualquiera de E200-E206, en donde los tratamientos conjuntos se administran de acuerdo con el mismo régimen de dosis (por ejemplo, ambos tratamientos se administran diariamente) o de acuerdo con diferentes regímenes de dosis (por ejemplo, un tratamiento se administra diariamente y el otro tratamiento se administra semanalmente).

E208. El método de acuerdo con cualquiera de E200-E207, en donde los tratamientos conjuntos se administran a un sujeto por la misma vía de administración o por vías de administración diferentes.

E209. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161 en la elaboración de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o afección mediado por E-selectina (por ejemplo, SCD).

E210. El uso de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125 o E221 en la elaboración de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad, trastorno o afección asociado con, o mediado por, la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a un ligando.

E211. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161 en la elaboración de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad, trastorno o afección asociado con, o mediado por, la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a un ligando.

E212. Un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125 o E221, o la composición farmacéutica de acuerdo con E152-E161, para su uso como un medicamento.

E213. Un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de E1-E125 o E221, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD.

E214. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, para su uso de acuerdo con E213, en donde el síntoma de SCD es VOC.

E215. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, para su uso de acuerdo con cualquiera de E213-214, en donde el tratamiento y/o la prevención comprenden además un agente terapéutico adicional, tal como, entre otros, al menos otro compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD.

E216. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, para su uso de acuerdo con E215, en donde el agente terapéutico adicional es un agente que es un tratamiento de referencia para la prevención y/o el tratamiento de al menos un signo y/o síntoma de SCD (por ejemplo, L-glutamina, hidroxiurea, una transfusión de sangre y cualquier otro tratamiento conocido en el estado de la técnica).

E217. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, para su uso de acuerdo con E215-216, en donde el tratamiento y/o la

prevención comprenden i) una cantidad terapéuticamente eficaz y sinérgica del anticuerpo anti-E-selectina o fragmento de fijación al antígeno de este y ii) una cantidad terapéuticamente eficaz y sinérgica del agente terapéutico adicional.

E218. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica, para su uso de acuerdo con E215 o 216, en donde el tratamiento y/o la prevención comprende i) una cantidad terapéuticamente eficaz y sinérgica del anticuerpo anti-E-selectina o fragmento de fijación al antígeno de este y ii) una cantidad terapéuticamente eficaz y sinérgica de la modalidad de tratamiento.

E219. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161, en donde la cantidad adecuada de cada compuesto, como se usa en la combinación para la administración a un paciente con SCD, se determina al tener en cuenta al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en la edad, el peso, la salud general, el compuesto administrado, la vía de administración, la naturaleza y el progreso del tratamiento contra la SCD y la presencia de otros medicamentos.

E220. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de E152-E161, formulada para su uso como un medicamento para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por E-selectina (por ejemplo, SCD).

E221. Un anticuerpo monoclonal aislado que se fija específicamente a E-selectina, en donde el anticuerpo es el anticuerpo 0039, 0164, 0158, 0159, 0170, 0180, 0841, 1282 1284, 1444 o 1448.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[00017] La **Figura 1** representa una estructura de cristal de ejemplo de Fab del anticuerpo anti-E-selectina 0164 cocrystalizado con E-selectina humana truncada. La E-selectina se muestra como una superficie gris (molécula a la derecha). El Fab 0164 (molécula a la izquierda) se muestra como cintas con VL en gris claro y VH en gris oscuro.

[00018] La **Figura 2** representa datos de ejemplo de un análisis de espectroscopía de masas de tres partes de un anticuerpo anti-E-selectina optimizado 0841 en el momento 0 (T0) y después del almacenamiento a 40 °C durante 4 semanas en amortiguador Tris (TrisT4), amortiguador de histidina (HisT4) o amortiguador de ácido glutámico (Glu4).

[00019] La **Figura 3** representa un análisis ELISA de competencia de ejemplo del anticuerpo 841 (también conocido como 0841) tras degradación forzada. El anticuerpo 841 se analizó en el momento 0 (0wk) y después de la incubación en amortiguador Tris, His o Glu durante 2 semanas (2wk) o 4 semanas (4wk) a 40 °C.

[00020] La **Figura 4** representa epítomos de linfocitos T que no son de línea germinal previstos para las regiones de VH y VL del anticuerpo humanizado 0841. Los residuos de aminoácidos que abarcarán epítomos de linfocitos T no encontrados en líneas germinales humanas según lo previsto mediante Epivax/ISPRI o IEDB están subrayados.

[00021] La **Figura 5** representa una neutralización de ejemplo de la adhesión del ligando sialil Lewis A a células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan E-selectina humana. Los anticuerpos evaluados incluyeron los anticuerpos anti-E-selectina 164 (también conocido como 0164), 1282, 1284, 1444 y 1448 y un control de isotipo IgG.

[00022] La **Figura 6** representa una neutralización de ejemplo de la adhesión del ligando sialil Lewis X a células CHO que expresan E-selectina de *Macaca fascicularis*. Los anticuerpos evaluados incluyeron los anticuerpos anti-E-selectina 164 (también conocido como 0164), 1282, 1284, 1444, 1448 y un control de isotipo IgG.

[00023] La **Figura 7** representa una neutralización de ejemplo de la adhesión de células HL-60 a células CHO que expresan E-selectina humana por parte de los anticuerpos 1282, 1284, 1444, 1448 y 164 (también conocido como 0164).

[00024] La **Figura 8** representa datos de ejemplo de un análisis de espectroscopía de masas de tres partes de un anticuerpo anti-E-selectina optimizado 1444 en el momento 0 (panel superior) y después del almacenamiento a 40 °C durante 4 semanas en amortiguador Tris, His o Glu.

[00025] Las **Figuras 9A-9D** representan un análisis ELISA de competencia de ejemplo de los anticuerpos 1282 (Figura 9A), 1284 (Figura 9B), 1444 (Figura 9C) y 1448 (Figura 9D) tras degradación forzada. Los anticuerpos se analizaron en el momento 1 (T0) y después de la incubación en amortiguador Tris, His o Glu durante 2 semanas (T2) o 4 semanas (T4) a 40 °C.

[00026] Las **Figuras 10A-10D** representan un análisis aSEC de muestras de concentración alta de muestras de anticuerpo anti-E-selectina optimizado. Se analizaron anticuerpos a una concentración de 150 mg/ml en el momento 0 (0) y después del almacenamiento a 4 °C o 25 °C en amortiguador Tris/Suc, His/Suc o Glu/Tre durante 1, 2, 4, 6 y 7 semanas. Se cuantificó el porcentaje de especies de masa molecular alta (% de HMMS). La Figura 10A representa resultados del anticuerpo 1282; la Figura 10B representa resultados del anticuerpo 1284; la Figura 10C representa resultados del anticuerpo 1444; la Figura 10D representa resultados del anticuerpo 1448.

[00027] La **Figura 11** representa curvas de viscosidad de ejemplo de anticuerpos anti-E-selectina optimizados. La viscosidad de los anticuerpos optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448 se midió mediante un método a base de microesferas DLS. Se proporcionan puntos de datos individuales adicionales para cada uno mediante un método de cono y placa de Anton Paar.

[00028] La **Figura 12** representa un análisis SPR de ejemplo de la fijación del anticuerpo optimizado 1444 a E-selectina humana (rhE-selectina), homólogos de P-selectina y L-selectina y homólogos de especies de conejo, rata, ratón (muE-selectina) y *Macaca fascicularis* (rcyE-selectina).

[00029] La **Figura 13** representa una fijación de ejemplo de anticuerpos anti-E-selectina (0841, 1282, 1284, 1444 y 1448) a L-selectina humana y P-selectina humana inmovilizadas. Un anticuerpo de control anti-L-selectina y un anticuerpo de control anti-P-selectina se fijaron a L-selectina humana y P-selectina humana, respectivamente.

[00030] La **Figura 14** representa una neutralización de ejemplo de la adhesión de células de pacientes con SCD (donante 11253 y donante 22358) a E-selectina recombinante en flujo fisiológico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00031] La presente divulgación proporciona anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, que se fijan específicamente a E-selectina y reducen o inhiben la actividad de la E-selectina, que incluye, entre otros, la capacidad de la E-selectina para interactuar (por ejemplo, fijarse) con ligandos que comprenden estructuras de carbohidratos con un determinante sialil Lewis (sLex) en glucoproteínas o glucolípidos. La divulgación también proporciona procesos para elaborar, preparar o producir anticuerpos anti-E-selectina. Los anticuerpos de la divulgación son útiles en el diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento de trastornos o afecciones mediados por, o asociados con, la actividad de la E-selectina (por ejemplo, fijación), que incluyen, entre otros, SCD, crisis vasooclusiva, dolor, infarto de órganos, isquemia, apoplejía y obstrucción vascular. La divulgación abarca además la expresión de anticuerpos, y la preparación y elaboración de composiciones que comprenden los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, tales como medicamentos para el uso de los anticuerpos.

[00032] Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos que se fijan a E-selectina, o fragmentos de fijación al antígeno de estos. También se proporcionan polinucleótidos que codifican cadenas pesadas o cadenas livianas de los anticuerpos, o ambas. Se proporcionan células huéspedes que expresan anticuerpos anti-E-

selectina. Se proporcionan métodos de tratamiento mediante el uso de anticuerpos contra E-selectina. Tales métodos incluyen, entre otros, métodos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con o mediadas por la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a ligandos sLex, que incluyen, entre otros, SCD, crisis vasooclusiva, dolor, infarto de órganos, isquemia, apoplejía, disfunción de órganos vitales, síndrome torácico agudo y obstrucción vascular.

[00033] Sin limitarse a ninguna teoría en particular, la familia de selectinas de moléculas de adhesión (por ejemplo, E-selectina) y sus ligandos cumplen una función crucial en la regulación del contacto inicial de la adhesión entre células, el rodamiento de leucocitos en el endotelio, la activación de integrina y la transmigración de células, todos parte de una respuesta proinflamatoria en SCD que se manifiesta clínicamente como episodios de dolor agudo o crisis vasooclusiva (que incluye, por ejemplo, obstrucción vascular, infarto de órganos e isquemia). Por lo tanto, los anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, de la divulgación permiten el antagonismo selectivo de la actividad y fijación de la E-selectina en el sistema vascular, lo cual reduce la vasooclusión en un sujeto. En algunas formas de realización divulgadas en los Ejemplos en la presente, los anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, contra E-selectina mostraron que inhiben, neutralizan o reducen la fijación de E-selectina a sus ligandos cuando la E-selectina está en una solución o expresada en células (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), neutrófilos y/o células sanguíneas de pacientes con SCD) y sus ligandos están en una solución o expresados en células (por ejemplo, células HL-60, células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), células endoteliales microvasculares pulmonares de *Macaca fascicularis* (CLMEC)).

[00034] Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, que incluye un anticuerpo humanizado, se puede usar, solo o en combinación con un segundo tratamiento, en la prevención, el tratamiento y/o la mejora de al menos un signo y/o síntoma de SCD, que incluyen crisis vasooclusiva, dolor, infarto de órganos, isquemia, apoplejía y obstrucción vascular.

[00035] Los encabezados de sección utilizados en la presente tienen solo fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos del objeto descrito.

[00036] Todas las referencias citadas en la presente, incluidas las solicitudes de patente, las publicaciones de patentes y los números de acceso de UniProtKB se incorporan en la presente por referencia, como si se indicara específica e individualmente que cada referencia individual se incorpora por referencia en su

totalidad.

[00037] Las personas del oficio de nivel medio comprenden en general y emplean comúnmente las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en la presente mediante metodología convencional, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al*. ed., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor ed. (1995)), Harlow y Lane, ed. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, ed., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, ed.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, ed., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis *et al*., ed., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al*., ed., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, ed., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, ed., Harwood Academic Publishers, 1995); y versiones actualizadas de estos.

[00038] La presente divulgación se puede comprender con mayor facilidad por referencia a la siguiente descripción detallada de formas de realización de ejemplo de la invención y los Ejemplos incluidos en ella.

[00039] Cuando los aspectos o las formas de realización de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente invención abarca no solo el grupo entero indicado en su totalidad, sino también cada miembro del grupo por separado y todos los subgrupos posibles del grupo principal, y también el grupo principal en caso de ausencia de uno o más de los

miembros del grupo. La presente invención también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

Definiciones

[00040] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que les otorga habitualmente una persona de nivel medio del oficio al que pertenece la invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluso las definiciones.

[00041] Además, a menos que el contexto requiera lo contrario o se indique expresamente lo contrario, los términos en singular incluirán el plural, y los términos en plural incluirán el singular.

[00042] Sin perjuicio de que los rangos y parámetros numéricos que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos que se indican en los ejemplos específicos se informan de la manera más precisa posible. Sin embargo, todos los valores numéricos contienen intrínsecamente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar que se encuentra en sus mediciones de prueba respectivas. Además, se debe tener en cuenta que todos los rangos descritos en la presente abarcan todos los subrangos que se incluyen en ellos. Por ejemplo, se debe considerar que un determinado rango de "1 a 10" incluye todos los subrangos entre (e incluso) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10; es decir, todos los subrangos que comienzan con un valor mínimo de 1 o más, por ejemplo, de 1 a 6,1, y finalizan con un valor máximo de 10 o menos, por ejemplo, de 5,5 a 10.

[00043] Como se usan en la presente, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que se indique lo contrario.

[00044] Como se usa en la presente, el término "y/o" se refiere a y abarca todas y cada una de las posibles combinaciones de uno o más de los elementos asociados enumerados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta alternativamente, "o".

[00045] Como se usa en la presente, la expresión "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a un valor medible, tal como una cantidad de la actividad biológica, longitud de una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos, contenido de nucleótidos G y C, índice de adaptación de codones, cantidad de dinucleótidos CpG, dosis, tiempo, temperatura y similares, y se pretende que abarque variaciones de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o incluso 0,1 %, en cualquier dirección

(mayor que o menor que) de la cantidad especificada a menos que se indique lo contrario, sea evidente a partir del contexto o excepto cuando tal número excedería 100 % de un valor posible.

[00046] Como se usa en la presente, el término "mejorar" significa una mejora detectable o medible en la enfermedad, el trastorno o la afección de un sujeto (por ejemplo, SCD) o síntoma de estos (por ejemplo, crisis vasooclusiva), o una respuesta celular subyacente. Una mejora detectable o medible incluye una disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación o control subjetivo u objetivo de la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración de, complicación causada por o asociada con, la mejora de un síntoma o una reversión de la enfermedad, trastorno o afección.

[00047] Como se usa en la presente, "otro" puede significar al menos un segundo o más. A menos que se defina de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos que se usan con respecto a la presente invención tendrán el significado que les otorgan habitualmente las personas del oficio de nivel medio. Además, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos en singular incluirán el plural, y los términos en plural incluirán el singular.

[00048] Como se usa en la presente, la expresión "asociado con" se refiere a entre sí, si la presencia, nivel y/o forma de uno se correlacionan con el del otro. Por ejemplo, una entidad en particular (por ejemplo, polipéptido, firma genética, metabolito, microbio, etc.) se considera asociada con una enfermedad, trastorno o afección en particular si la presencia, nivel y/o forma se correlacionan con la incidencia de y/o susceptibilidad a la enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, en una población relevante). En algunas formas de realización, dos o más entidades están "asociadas" físicamente entre sí si interactúan, directa o indirectamente, de modo que estén y/o permanezcan cerca físicamente entre sí. En algunas formas de realización, dos o más entidades que están asociadas físicamente entre sí están ligadas covalentemente entre sí; en algunas formas de realización, dos o más entidades que están asociadas físicamente entre sí no están ligadas covalentemente entre sí, sino que están asociadas de manera no covalente, por ejemplo, por medio de enlaces de hidrógeno, interacción de van der Waals, interacciones hidrófobas, magnetismo y una combinación de estos.

[00049] Como se usa en la presente, el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia que codifica una proteína en particular, o "ácido nucleico codificante" denota una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del mRNA) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo*

cuando se coloca bajo el control de (ligado operativamente a) secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio en el terminal 5' (amino) y un codón de detención de traducción en el terminal 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, entre otras, cADN de mRNA procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota e incluso secuencias de ADN sintético.

[00050] A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "comprender" o variaciones, tales como "comprende" o "que comprende", y las palabras "que tiene/que incluye", implicarán la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. A menos que el contexto indique lo contrario, los términos en singular incluirán el plural, y los términos en plural incluirán el singular. Todos los ejemplos posteriores a la expresión "por ejemplo" pretenden no ser exhaustivos ni limitativos. Se entiende que siempre que las formas de realización se describan en la presente con la expresión "que comprende", también se proporcionan otras formas de realización análogas descritas con las expresiones "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

[00051] Como se usa en la presente, el término "sustitución conservadora" se refiere al reemplazo de un aminoácido por un residuo biológica, química o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución no destruye una actividad biológica. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales con una longitud similar, tales como alanina, glicina y serina, o un tamaño similar. Similitud química significa que los residuos tienen la misma carga o son ambos hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de lisina por arginina, ácido aspártico por ácido glutámico o asparagina por glutamina, treonina por serina y similares. Los ejemplos particulares de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de lisina por arginina, ácido aspártico por ácido glutámico o asparagina por glutamina y similares. Por lo general, las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Una "sustitución conservadora" también incluye

el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido.

[00052] Como se usa en la presente, la expresión "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o un promotor inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión se liga operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que se transcribirá.

[0053] Como se usa en la presente, la expresión "dosis eficaz" o "cantidad eficaz" de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para obtener uno o más resultados deseados o beneficiosos. En aspectos más específicos, una cantidad eficaz previene, alivia y/o mejora al menos un signo y/o síntoma de una enfermedad, por ejemplo, SCD. Para uso profiláctico, los resultados deseados o beneficiosos incluyen la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o la demora del inicio de la enfermedad, lo que incluye un síntoma bioquímico, histológico y/o conductual de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se producen durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados deseados o beneficiosos incluyen resultados clínicos, tales como la reducción de al menos un signo y/o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección mediado por E-selectina, la disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la mejora del efecto de otros medicamentos y/o la demora de la progresión de la enfermedad en los pacientes. Una dosis eficaz se puede administrar en una o más administraciones. A los fines de la presente invención, una dosis eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se sabe en el ámbito clínico, una dosis eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por ello, una "dosis eficaz" se puede considerar en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y un solo agente se puede considerar administrado en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

[0054] Como se usa en la presente, el término "funcional" se refiere a una molécula biológica en una forma en la que exhibe una propiedad y/o actividad por la que se caracteriza. Una molécula biológica puede tener dos funciones (es decir, bifuncional) o muchas funciones (es decir, multifuncional).

[0055] Como se usa en la presente, la expresión "patrón de glucosilación" significa el patrón de unidades de carbohidratos que se unen covalentemente a una proteína (por ejemplo, la glicoforma) así como a los sitios en los cuales las glicoformas se unen covalentemente a la cadena principal peptídica de una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina.

[0056] Como se usa en la presente, el término "homólogo" u "homología" se refiere a dos o más entidades de referencia (por ejemplo, secuencias de nucleótidos o polipéptidos) que comparten al menos identidad parcial con una región o fragmento determinado. Por ejemplo, cuando una posición de aminoácido en dos péptidos está ocupada por aminoácidos idénticos, los péptidos son homólogos en esa posición. Notablemente, un péptido homólogo retendrá la actividad o función asociada con el péptido no modificado o de referencia, y el péptido modificado tendrá generalmente una secuencia de aminoácidos "sustancialmente homóloga" con la secuencia de aminoácidos de la secuencia no modificada. Cuando se hace referencia a un polipéptido, ácido nucleico o fragmento de estos, "homología sustancial" o "similitud sustancial" significa que, cuando se alinea de manera óptima con inserciones o eliminaciones adecuadas con otro polipéptido, ácido nucleico (o su cadena complementaria) o fragmento de estos, existe identidad de secuencia en al menos de alrededor de 95 % a 99 % de la secuencia. El grado de homología (identidad) entre dos secuencias se puede determinar mediante el uso de un programa informático o algoritmo matemático. Tales algoritmos que calculan el porcentaje de homología (o identidad) de secuencia representan generalmente los espacios o errores de apareamiento de secuencias con respecto a la región o área de comparación. Más adelante se proporcionan programas y algoritmos de ejemplo.

[0057] Como se usan en la presente, las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se usan de manera indistinta y significan una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vectores para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen "transformantes", "células transformadas" y "células transducidas", que incluyen la célula transformada o transducida primaria y la progenie derivada de esta independientemente de la cantidad de pases. La progenie de una célula huésped puede no ser necesariamente completamente idéntica (en términos de morfología o complemento de ADN genómico) a la célula de origen debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas. Una célula huésped incluye células transfectadas y/o transformadas *in vivo* con un polinucleótido de esta invención (por ejemplo, un

polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-E-selectina).

[0058] Como se usa en la presente, el término "identidad" o la expresión "idéntico a" se refiere a la similitud general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre dos o más secuencias, en donde las alineaciones de espacios son abordadas por un modelo matemático particular de programas informáticos (es decir, "algoritmos").

[0059] En algunas formas de realización, se considera que las moléculas poliméricas son "sustancialmente idénticas" entre sí si sus secuencias son al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas.

[0060] El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, por ejemplo, se puede hacer al alinear las dos secuencias con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia para la alineación óptima y se pueden descartar secuencias no idénticas con fines de comparación). En ciertas formas de realización, la longitud de una secuencia alineada con fines de comparación es al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de la longitud de una secuencia de referencia. Luego se comparan los nucleótidos en las posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo (por ejemplo, nucleótido o aminoácido) que ocupa la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta la cantidad de espacios y la longitud de cada espacio, que debe introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias puede obtenerse con un algoritmo matemático.

[0061] Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se pueden alinear utilizando los métodos y programas informáticos, incluido BLAST, disponibles en internet en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Los programas de alineación incluyen el programa MegAlign® en la suite de software de bioinformática Lasergene® (DNASTAR®, Inc., Madison, WI). Otro programa de alineación es FASTA, disponible

en el paquete Genetics Computing Group (GCG), de Madison, Wis., EE. UU. Otras técnicas para la alineación se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc. Los programas de alineación que permiten espacios en la secuencia son de particular interés. Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite espacios en las alineaciones de secuencias. Ver *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). Además, el programa GAP que utiliza el método de alineación de Needleman y Wunsch puede utilizarse para alinear secuencias. Ver *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970).

[0062] También es de interés el programa BestFit, que usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489) para determinar la identidad de secuencia. La penalización por generación de espacio oscilará generalmente de 1 a 5, normalmente de 2 a 4 y, en algunas formas de realización, será de 3. La penalización por extensión de espacio oscilará generalmente de alrededor de 0,01 a 0,20 y, en algunos casos, será de 0,10. El programa tiene parámetros predeterminados determinados por las secuencias ingresadas para comparar. Preferentemente, la identidad de secuencia se determina mediante el uso de los parámetros predeterminados determinados por el programa. Este programa también está disponible a través del paquete Genetics Computing Group (GCG), de Madison, WI, EE. UU.

[0063] Otro programa de interés es el algoritmo FastDB. FastDB se describe en *Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, páginas 127-149, 1988, Alan R. Liss, Inc. FastDB calcula el porcentaje de identidad de secuencia en función de los siguientes parámetros: penalización por errores de apareamiento: 1,00; penalización por espacio: 1,00; penalización por tamaño de espacio: 0,33; y penalización por unión: 30,0.

[0064] Como se usa en la presente, los términos "aumentar", "mejorar", "disminuir" o "reducir" indican valores relativos con respecto a una medición inicial, tal como una medición en el mismo individuo antes del comienzo del tratamiento descrito en la presente, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en la presente. En algunas formas de realización, un "individuo de control" es un individuo que padece la misma forma de enfermedad o lesión que un individuo en tratamiento. En algunas formas de realización, un "individuo de control" es un individuo que no padece la misma forma de enfermedad o lesión que un individuo en tratamiento.

[0065] Como se usa en la presente, la expresión "molécula aislada" (cuando la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este) significa una molécula que, debido a su origen o fuente de derivación, (1) no está asociada con componentes asociados naturalmente que la acompañan en su estado natural, (2) se encuentra sustancialmente libre de otras moléculas de la misma especie, (3) se expresa mediante una célula de una especie diferente o (4) no se produce naturalmente. Por ello, una molécula que se expresa o sintetiza de manera química en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente se considerará "aislada" de sus componentes asociados naturalmente. Una molécula también puede quedar prácticamente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento usando técnicas de purificación conocidas en el estado de la técnica. La homogeneidad o pureza molecular se pueden analizar mediante varios métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptidos se puede analizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción del gel para visualizar el polipéptido, usando técnicas conocidas en el estado de la técnica. Para ciertos fines, se puede proporcionar una mayor resolución usando HPLC u otros métodos de purificación conocidos en el estado de la técnica.

[0066] Como se usan en la presente, las expresiones "péptido líder" o "secuencia líder" o "secuencia de señal líder" o "secuencia de señal" (usados indistintamente en la presente) significan cualquier secuencia de ácidos nucleicos, o secuencia de aminoácidos codificada por aquella, que puede estar presente en el extremo 5' de una molécula de ácido nucleico y/o en o cerca del terminal N de un polipéptido, que, cuando está presente, puede mediar el transporte del polipéptido a una organela de destino, que incluye, entre otros, la secreción del polipéptido desde una célula. Dichas secuencias líder incluyen, entre otras, secuencias de ácidos nucleicos que comprenden, por ejemplo, ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTTCTTCCTGTCAGTAACTACAGGTGTCCACTC C (SEQ ID NO: 140) y ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTGGCAACAGCTACAGGCGTGCACT CC (SEQ ID NO: 141), y secuencias de aminoácidos codificadas por aquellas, tales como, entre otras, MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 129) y MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 130) u otras secuencias líder tales como MGWSCILFLVATATGAHS (SEQ ID NO: 131). La invención abarca esta y otras señales líder (secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos) conocidas en el estado

de la técnica o no identificadas que pueden dar lugar al transporte de un polipéptido a la organela deseada, por ejemplo, el retículo endoplásmico, y/o segregarse desde la célula. En general, el péptido de señal es eliminado del polipéptido maduro, y/o no se encuentra presente en este.

[0067] Como se usa en la presente, el término "residuo" significa una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, la asparagina 297 (también denominada Asn297 o N297) es un residuo en un anticuerpo humano IgG1.

[0068] El término "similitud" es un concepto relacionado, pero, a diferencia de "identidad", se refiere a una medida de similitud que incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias de sustituciones conservadoras. Dado que las sustituciones conservadoras se aplican a los polipéptidos pero no a las moléculas de ácido nucleico, la similitud solo se aplica a las comparaciones de secuencias de polipéptidos. Si dos secuencias de polipéptidos tienen, por ejemplo, 10 de 20 aminoácidos idénticos, y el restante son todas sustituciones no conservadoras, entonces los porcentajes de identidad y similitud serían ambos de 50 %. Si, en el mismo ejemplo, hay 5 posiciones adicionales con sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad sigue siendo 50 %, pero el porcentaje de similitud sería de 75 % (15 de 20). Por lo tanto, en casos en los que haya sustituciones conservadoras, el grado de similitud entre dos secuencias de polipéptidos será mayor al porcentaje de identidad entre ambas secuencias.

[0069] Como se usa en la presente, el término "sujeto" significa un mamífero, con mayor preferencia, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, entre otros, animales de granja (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gallinas, etc.), mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas. En algunas formas de realización, un sujeto es un paciente. En algunas formas de realización, el individuo está en riesgo de tener una enfermedad, trastorno o afección mediados por o asociados con la fijación de E-selectina a su ligando. En algunas formas de realización, un sujeto es un paciente con una enfermedad, trastorno o afección como se describe en la presente, por ejemplo, SCD. En algunas formas de realización, un sujeto (por ejemplo, un paciente) tiene SCD, una variante de SCD o enfermedad de SC. En algunas formas de realización, un sujeto (por ejemplo, un paciente) tiene un genotipo variante de HBSS, HBSC, HBS/ β^* thal, HBS/ β^* thal, HBS/HPHP, HBSE o HBS.

[0070] Como se usa en la presente, la expresión "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en términos de molaridad, es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición),

y, preferentemente, una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto (por ejemplo, una glucoproteína, incluso un anticuerpo o receptor) comprende al menos alrededor de 50 % (en términos de molaridad) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de alrededor de 80 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, con mayor preferencia, más de alrededor de 85 %, 90 %, 95 % y 99 %. Con máxima preferencia, la especie objeto se purifica hasta ser esencialmente homogénea (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular. En algunas formas de realización, un material sustancialmente puro es al menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), con mayor preferencia, al menos 90 % puro, con mayor preferencia, al menos 95 % puro, aun con mayor preferencia, al menos 98 % puro y, con máxima preferencia, al menos 99 % puro.

[0071] Los "fragmentos" o "porciones" de polipéptidos o anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden elaborar mediante truncamiento, por ejemplo, mediante eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos del terminal N y/o C de un polipéptido. De esta manera, se pueden eliminar uno, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40 o más aminoácidos del terminal N y/o C. También se pueden generar fragmentos mediante una o más eliminaciones internas.

[0072] Como se utilizan en la presente, las expresiones "secuencia de ácidos nucleicos" y "secuencia de nucleótidos" se refieren de manera indistinta a cualquier molécula compuesta de nucleótidos monoméricos o comprendida por estos. Un ácido nucleico puede ser un oligonucleótido o un polinucleótido. Una secuencia de nucleótidos puede ser un ADN o ARN (por ejemplo, ADN genómico, cADN, ADN antisentido, mARN, tARN, rARN, etc.). Una secuencia de nucleótidos puede ser modificada químicamente o artificial. Las secuencias de nucleótidos incluyen ácidos peptidonucleicos (PNA), morfolinos, y ácidos nucleicos bloqueados (LNA), así como ácidos nucleicos glicólicos (GNA) y ácidos nucleicos treósicos (TNA). Cada una de estas secuencias se distingue del ADN o ARN natural por cambios en la cadena principal de la molécula. También pueden utilizarse nucleótidos de fosforotioato. Otros análogos de desoxinucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'-P5'-fosforamidatos y fosforotioatos de oligorribonucleótido y sus análogos de 2'-O-alilo y metilfosfonatos de 2'-O-metilribonucleótido que pueden utilizarse en una secuencia de nucleótidos de la divulgación.

[0073] Como se usa en la presente, la expresión "constructo de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico no natural que resulta del uso de tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, un ácido nucleico recombinante). Un constructo de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico, ya sea monocatenaria o bicatenaria, que se ha modificado para contener segmentos de secuencias de ácidos nucleicos, que se combinan y disponen de una forma no natural. Un constructo de ácido nucleico puede ser un "vector" (por ejemplo, un plásmido), es decir, una molécula de ácido nucleico diseñada para suministrar ADN a una célula huésped de manera exógena.

[0074] Como se usa en la presente, la expresión "ligado operativamente" se refiere a un enlace de elementos de polinucleótido (o polipéptido) en una relación funcional. Un ácido nucleico está ligado operativamente cuando se lo coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor u otra secuencia reguladora de la transcripción (por ejemplo, un potenciador) está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia codificante. En algunas formas de realización, ligado operativamente significa que las secuencias de ácidos nucleicos ligadas son contiguas. En algunas formas de realización, ligado operativamente no significa que las secuencias de ácidos nucleicos están ligadas de manera contigua, sino que las secuencias intervinientes se encuentran entre aquellas secuencias de ácidos nucleicos que están ligadas.

[0075] Como se usa en la presente, el término "polinucleótido" (también denominado en la presente "molécula de ácido nucleico") se refiere a una secuencia de nucleótidos conectada por enlaces de fosfodiéster. Los polinucleótidos se presentan en la presente en la dirección 5' a 3'. Un polinucleótido de la presente divulgación puede ser una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) o una molécula de ácido ribonucleico (ARN) y se refiere a todas las formas de ácido nucleico, tales como moléculas bicatenarias, moléculas monocatenarias, ARN de horquilla pequeña o corta (shARN), micro ARN, ARN interferente pequeño o corto (siARN), ARN trans-empalme, ARN antisentido. Cuando un polinucleótido es una molécula de ADN, dicha molécula puede ser un gen, un cADN, una molécula antisentido o un fragmento de cualquiera de las moléculas anteriores. Las bases de nucleótidos se indican en la presente con un código de una sola letra: adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C), inosina (I) y uracilo (U). Un polinucleótido de la presente divulgación puede prepararse mediante técnicas estándar conocidas por las personas del oficio de nivel medio.

[0076] Como se usan en la presente, los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido"

codificados por un polinucleótido (secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de nucleótidos) se refieren a secuencias nativas de longitud completa, como con proteínas naturales, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencia siempre que la subsecuencia, forma modificada o variante retenga cierto grado de funcionalidad de la proteína nativa de longitud completa. En métodos y usos de la divulgación, dichos polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias de polinucleótidos pueden ser, pero no necesariamente, idénticos a la proteína endógena que es defectuosa, o cuya expresión es insuficiente, o deficiente en el sujeto tratado con tratamiento génico.

[0077] Como se usa en la presente, el término "prevenir" o "prevención" se refiere a un retraso del inicio y/o una reducción en la frecuencia y/o gravedad de al menos un signo y/o síntoma (por ejemplo, crisis vasooclusiva, dolor) de una enfermedad, trastorno o afección particular (por ejemplo, SCD). En algunas formas de realización, la prevención se evalúa en función de una población, de modo que se considera que un agente "previene" una enfermedad, trastorno o afección particular si se observa una disminución estadísticamente significativa en el desarrollo, frecuencia y/o intensidad de uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección en una población susceptible a la enfermedad, trastorno o afección. La prevención puede considerarse completa cuando el inicio de la enfermedad, trastorno o afección se ha retrasado un período predefinido de tiempo.

[0078] Como se usa en la presente, el término "recombinante" se refiere a un vector, polinucleótido, polipéptido o célula que es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción, y ligadura (por ejemplo, en relación a un polinucleótido o polipéptido comprendido allí), y/u otros procedimientos que dan lugar a un constructo que es diferente a un producto natural.

[0079] Como se usa en la presente, el término "tratar" o "tratamiento" significa administrar un tratamiento que, de forma parcial o completa, alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa el inicio de, reduce la gravedad de, y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y causas de una enfermedad, trastorno y/o afección particular (por ejemplo, SCD). A los fines de la invención, los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: mejora de la tasa de supervivencia (menor mortalidad), reducción de la cantidad de fibrosis tisular, disminución del alcance del daño causado por la enfermedad, disminución de la duración de la enfermedad, y/o reducción de la cantidad, alcance o duración de los síntomas relacionados con la enfermedad. El término incluye la administración de un

compuesto o agente de la presente invención para prevenir o demorar el inicio de un síntoma, complicación o indicio bioquímico de una enfermedad, aliviar un síntoma o detener o inhibir el desarrollo adicional de una enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o demorar el inicio de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de un síntoma clínico o subclínico de esta) o puede ser la supresión o alivio terapéutico de un síntoma después de la manifestación de la enfermedad. En algunas formas de realización, la enfermedad, trastorno o afección es SCD.

Anticuerpos

[0080] Un "anticuerpo" o "Ab" es una molécula de inmunoglobulina que puede reconocer y fijarse a una diana o antígeno (Ag) específico, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" puede abarcar cualquier tipo de anticuerpo, incluso, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos (o porciones) de fijación al antígeno, de anticuerpos intactos que retienen la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, E-selectina), y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno.

[0081] Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o una subclase de estos), y no es necesario que el anticuerpo sea de una clase en particular. Según la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas (HC), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina de la presente divulgación es un anticuerpo IgG1. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Se conocen las estructuras y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

[0082] Los anticuerpos pueden derivar de cualquier mamífero, incluso, entre otros, seres humanos, monos, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos, ratones, ratas (por ejemplo, una rata Sprague Dawley) etc., u otros animales, tales como aves (por ejemplo, pollos), peces (por ejemplo, tiburones) y camélidos (por ejemplo, llamas).

[0083] La expresión "antígeno" se refiere a la entidad molecular utilizada para la inmunización de un vertebrado inmunocompetente para producir el anticuerpo que reconoce el antígeno o para cribar una colección de expresión (por ejemplo, una colección de expresión en fago, levadura o ribosoma, entre otras). En la presente, el antígeno se expresa de manera más amplia y por lo general pretende incluir moléculas diana que el anticuerpo reconoce específicamente, por lo cual incluye fragmentos o miméticos de la molécula utilizada en un proceso de inmunización para generar el anticuerpo o en el cribado de colecciones para seleccionar el anticuerpo. Por lo tanto, en el caso de los anticuerpos de la invención que se fijan a E-selectina, la E-selectina de longitud completa de especies de mamíferos (por ejemplo, ser humano, mono (incluso *Macaca fascicularis*), ratón, conejo, y rata), incluso monómeros y multímeros, tales como dímeros, trímeros, etc. de esta, la E-selectina truncada u otras variantes de esta (por ejemplo, dominio extracelular), así como la E-selectina soluble y la E-selectina expresada en la superficie celular, se denominan antígenos en la presente.

[0084] La expresión "fragmento de fijación al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que retienen la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno (preferentemente con sustancialmente la misma afinidad de fijación). Se demostró que los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de fijación al antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de fijación abarcados por la expresión "fragmento de fijación al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 1989; 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, Fv ligados por disulfuro (dsFv) e intracuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id). Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante métodos recombinantes, con un ligador sintético que les permite formarse como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); ver, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 1988; 242:423-426 y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1988 USA 85:5879-5883. También se encuentran abarcadas otras formas de anticuerpos monocatenarios,

tales como los diacuerpos. La expresión "fragmento de fijación al antígeno" de un anticuerpo también pretende abarcar tales anticuerpos monocatenarios. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos, en donde los dominios VH y VL se expresan en una cadena de polipéptidos simple, pero usando un ligador que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de fijación al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:6444-6448; Poljak *et al.*, Structure 1994; 2:1121-1123).

[0085] Un "dominio variable" de anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena liviana (VL) del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Como se sabe en el estado de la técnica, cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana consiste en cuatro regiones de marco (FR) conectadas por tres "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) y contribuye a la formación del sitio de fijación al antígeno de los anticuerpos. Si se desean variantes de una región variable objeto, particularmente con sustitución en los residuos de aminoácidos fuera de una región CDR (es decir, en la región de marco), se puede identificar la sustitución de aminoácidos adecuada, preferentemente la sustitución de aminoácidos conservadora, al comparar la región variable objeto con las regiones variables de otros anticuerpos que contienen secuencias CDR1 y CDR2 en la misma clase canónica que la región variable objeto (Chothia y Lesk, J Mol. Biol. 1987; 196(4): 901-917).

[0086] Los residuos en un dominio variable suelen ser numerados según Kabat, que es un sistema de numeración utilizado para los dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena liviana de la compilación de anticuerpos. Ver Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de FR o CDR del dominio variable o a una inserción en estas. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un solo inserto de aminoácidos (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 FR de la cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del

anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". Se encuentran disponibles diversos algoritmos para asignar la numeración de Kabat. Por ejemplo, el algoritmo implementado en el lanzamiento de la versión 2.3.3 de Abysis (www.abysis.org) puede usarse para asignar la numeración de Kabat a las regiones variables LCDR-1, LCDR-2, LCDR-3, HCDR-2, y HCDR-3, y la definición de AbM puede usarse luego para HCDR-1.

[0087] En algunas formas de realización, la delineación definitiva de una CDR y la identificación de residuos que comprenden el sitio de fijación de un anticuerpo se logran resolviendo la estructura del anticuerpo y/o la estructura del complejo anticuerpo-ligando. En algunas formas de realización, esto puede alcanzarse mediante cualquier variedad de técnicas conocidas por las personas del oficio de nivel medio, tales como cristalografía de rayos X. En algunas formas de realización, se pueden usar distintos métodos de análisis para identificar o aproximarse a las regiones CDR. Los ejemplos de esos métodos incluyen, entre otros, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM, la definición de contacto y la definición conformacional.

[0088] Las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) pueden identificarse de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la suma de Kabat y Chothia, AbM, contacto, North y/o definiciones conformacionales o cualquier método de determinación de CDR conocido en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. (regiones hipervariables); Chothia *et al.*, *Nature* 1989; 342:877-883 (estructuras de bucle estructurales). La identidad de los residuos de aminoácidos en un anticuerpo particular que conforma una CDR puede determinarse mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. La definición de AbM de las CDR está a mitad de camino entre Kabat y Chothia y utiliza el *software* de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Accelrys®).

[0089] La definición de "contacto" de las CDR se basa en la observación de contactos de antígeno, como se establece en MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1996; 262:732-745. La definición de "conformacional" de las CDR se basa en los residuos que realizan contribuciones entálpicas a la fijación al antígeno (ver, por ejemplo, Makabe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008; 283:1156-1166). North ha identificado conformaciones canónicas de CDR mediante un conjunto preferido diferente de definiciones de CDR (North *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2011; 406: 228-256). En otro enfoque, denominado en la presente "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR se pueden

identificar como los residuos que realizan contribuciones entálpicas a la fijación al antígeno (Makabe *et al.*, J. Biol. Chem. 2008, 283:1156-1166). De todos modos, otras definiciones de los límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero aun así se superpondrán con al menos una porción de las CDR de Kabat; sin embargo, se pueden acortar o alargar en virtud de los descubrimientos experimentales o predictivos de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR completas no tienen un impacto significativo sobre la fijación al antígeno. Como se usa en la presente, una CDR se puede referir a CDR definidas por cualquier enfoque conocido en el estado de la técnica, incluso combinaciones de enfoques. Los métodos utilizados en la presente pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier forma de realización dada que contenga más de una CDR, las CDR (u otros residuos del anticuerpo) se pueden definir de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, North, extendida, AbM y/o contacto y/o las definiciones conformacionales.

[0090] "Residuo en contacto", como se usa en la presente con respecto a un anticuerpo o el antígeno fijado específicamente a este, se refiere a un residuo de aminoácido presente en un anticuerpo/antígeno que comprende al menos un átomo pesado (es decir, no hidrógeno) que se encuentra a 4 Å o menos de un átomo pesado de un residuo de aminoácido presente en el anticuerpo/antígeno cognado.

[0091] Los residuos de "marco" (FR) son residuos del dominio variable del anticuerpo distintos de los residuos de CDR. Un marco de dominio VH o VL consta de cuatro subregiones de marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, intercaladas con las CDR en la siguiente estructura: FR1 – CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4.

[0092] Como se sabe en el estado de la técnica, una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena liviana del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación.

[0093] Las expresiones "región IgG Fc", "región Fc", "dominio Fc" y "Fc", como se usan indistintamente en la presente, se refieren a la porción de una molécula de inmunoglobulina (Ig) que se correlaciona con un fragmento cristizable obtenido mediante la digestión de papaína de una molécula Ig. Como se usan en la presente, las expresiones se refieren a la región constante de un anticuerpo sin incluir el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante y se refiere además a porciones de esa región. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD, e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y el terminal-N de bisagra

flexible de dichos dominios, o porciones de estos. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J.

[0094] Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cy2 y Cy3 (C gamma 2 y C gamma 3) y la bisagra entre Cy1 (C gamma 1) y Cy2 (C gamma 2). Si bien los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define por lo general para que comprenda residuos C226 o P230 hasta su terminal carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo al índice EU de Edelman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1969; 63(1):78-85 y como se describe en Kabat *et al.*, 1991. En general, el dominio Fc comprende de alrededor del residuo de aminoácido 236 a alrededor del 447 del dominio constante IgG1 humano. Una secuencia de aminoácidos de dominio Fc IgG1 de tipo silvestre humana de ejemplo se establece en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 15 (incluso un residuo de lisina (K) de terminal opcional). Polipéptido Fc puede referirse a esta región aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, o una proteína de fusión Fc.

[0095] El dominio constante de la cadena pesada comprende la región Fc y comprende además el dominio CH1 y la bisagra, como también los dominios CH2 y CH3 (y, opcionalmente, CH4 de IgA e IgE) de la cadena pesada de IgG.

[0096] Una "región Fc funcional" tiene al menos una función efectora de una región Fc de la secuencia nativa. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen la fijación a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); fijación al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B), activación de linfocitos B, etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de fijación (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este) y se pueden evaluar con diversos ensayos conocidos en el estado de la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

[0097] Como se usa en la presente, "receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se fija a la región Fc de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un Fc $\square$ R es un FcR humano nativo. Además, en algunas formas de realización, un FcR es uno que se fija a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\square$ RI, Fc $\square$ RII y Fc $\square$ RIII, incluso las variantes alélicas y, alternativamente, las formas empalmadas de esos receptores. Los receptores Fc $\square$ RII incluyen Fc $\square$ RIIA (un "receptor activador") y Fc $\square$ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de

aminoácidos similares que difieren, principalmente, en los dominios citoplásmicos de estos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo activador a base de tirosina inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo inhibidor a base de tirosina inmunoreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico (ver, por ejemplo, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15:203-234). Se hace una reseña de los FcR, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 1991; 9:457-92; Capel *et al.*, *Immunomethods*, 1994; 4:25-34; y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 1995; 126:330-41. Otros FcR, incluso aquellos que se identificarán en el futuro, se encuentran comprendidos en el término "FcR" de la presente.

[0098] El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 1976; 117:587 y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 1994; 24:249) y la regulación de la homeóstasis de inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la fijación a FcRn (ver, por ejemplo, Ghetie y Ward., *Immunol. Today* 1997; 18(12):592-598; Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 1997; 15(7):637- 640; Hinton, *et al.*, *J Biol. Chem.* 2004; 279(8):6213-6216; WO 2004/92219).

[0099] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunas formas de realización, las células expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células *natural killer* (NK), monocitos, macrófagos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

[00100] Como se usa en la presente, "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig segregada fijada a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se fijen específicamente a una célula diana que porta el antígeno y que posteriormente inactiven la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en las patentes estadounidenses N.º 5.500.362, 5.821.337 o 6.737.056. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células PBMC y NK. De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés

se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1998; 95:652-656. Se describen anticuerpos adicionales con secuencias de aminoácidos de la región Fc alterada y actividad de ADCC aumentada o disminuida, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.923.538, y la patente estadounidense N.º 7.994.290.

[00101] Un anticuerpo que tiene una "actividad de ADCC mejorada" se refiere a un anticuerpo que media más eficazmente ADCC *in vitro* o *in vivo* en comparación con el anticuerpo parental, en donde el anticuerpo y el anticuerpo parental difieren en al menos un aspecto estructural, y cuando las cantidades del anticuerpo y anticuerpo parental utilizadas en el ensayo son esencialmente iguales. En algunas formas de realización, el anticuerpo y el anticuerpo parental tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero el anticuerpo está afucosilado y el anticuerpo parental está fucosilado. En algunas formas de realización, la actividad de ADCC se determinará con el ensayo de ADCC *in vitro* divulgado en la presente, pero se contemplan otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, por ejemplo, en un modelo animal. En algunas formas de realización, un anticuerpo con actividad de ADCC mejorada tiene mayor afinidad con RIIIA Fc gamma.

[00102] Un anticuerpo con afinidad de fijación a FcR o actividad de ADCC "alterada" tiene una actividad de fijación a FcR y/o actividad de ADCC mejorada o disminuida en comparación con un anticuerpo parental, en donde el anticuerpo y el anticuerpo parental difieren en al menos un aspecto estructural. Un anticuerpo que "muestra una mayor fijación" a un FcR se fija a al menos un FcR con mayor afinidad que el anticuerpo parental. Un anticuerpo que "muestra una menor fijación" a un FcR se fija a al menos un FcR con menor afinidad que el anticuerpo parental. Tales anticuerpos que muestran una menor fijación a un FcR pueden tener poca fijación perceptible, o ninguna en absoluto, a un FcR, por ejemplo, 0-20 por ciento de fijación al FcR en comparación con una región Fc de IgG de secuencia nativa.

[00103] "Afinidad mejorada para FcγRIIIA" se refiere a un anticuerpo que tiene mayor afinidad para FcγRIIIA que un anticuerpo parental, en donde el anticuerpo y el anticuerpo parental difieren en al menos un aspecto cultural.

[00104] "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de un complemento. La activación de la vía de complemento clásica se inicia mediante la fijación del primer componente del sistema complementario (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que se fijan a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un

ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 1996; 202: 163. Se describen anticuerpos con secuencias de aminoácidos de región Fc alterada y mayor o menor capacidad de fijación a Clq, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 6.194.551, patente estadounidense N.º 7.923.538, patente estadounidense N.º 7.994.290 y WO 1999/51642.

[00105] Un dominio constante de la cadena pesada comprende una región Fc y comprende además el dominio CH1 y la bisagra, como también los dominios CH2 y CH3 (y, opcionalmente, CH4 de IgA e IgE) de la cadena pesada de IgG.

[00106] En algunas formas de realización, cuando un anticuerpo anti-E-selectina comprende un residuo de aminoácido de lisina (K) del terminal C en un polipéptido de la cadena pesada (por ejemplo, la cadena pesada de IgG1 humana comprende una lisina del terminal), una persona del oficio de nivel medio entendería que el residuo de lisina puede truncarse, lo que da como resultado un anticuerpo con una cadena pesada sin residuo de lisina del terminal C. Además, la cadena pesada del anticuerpo puede producirse mediante el uso de un ácido nucleico que no codifica la lisina. Por lo tanto, en algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina comprende una cadena pesada en la que la lisina de terminal de otra manera presente no se encuentra presente.

[00107] En ciertas formas de realización, el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, descrito en la presente comprende un dominio Fc. El dominio Fc puede derivarse de IgA (por ejemplo, IgA₁ o IgA₂), IgD, IgE, IgM, o IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina es un anticuerpo IgG. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444) es un anticuerpo IgG₁.

[00108] Una proteína de "Fusión Fc" es una proteína en donde uno o más polipéptidos están ligados operativamente a un polipéptido Fc. Una fusión Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con un componente de fusión.

[00109] Una "región Fc de la secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc natural. Una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de la secuencia nativa en al menos una modificación de aminoácidos, pero aún retiene al menos una función efectora de la región Fc de la secuencia nativa. Preferentemente, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de la secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de alrededor de una a

alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y, preferentemente, de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de la secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La variante de la región Fc en la presente tiene, preferentemente, al menos alrededor de 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de la secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y, con máxima preferencia, al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con aquella, con mayor preferencia, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 %, al menos alrededor de 99 % de identidad de secuencia con aquella.

[00110] Un "epítipo" se refiere a un área o región de un antígeno a la que se fija específicamente un anticuerpo, por ejemplo, un área o región que comprende residuos que interactúan con el anticuerpo, según se determina mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, inmunoensayos convencionales o como se describe en los Ejemplos 9 y 10 de la presente divulgación. Hay muchos métodos conocidos en el estado de la técnica para mapear y caracterizar la ubicación de los epítipos en las proteínas, que incluyen disolver la estructura de cristal de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competencia, ensayos de expresión de fragmentos génicos y ensayos a base de péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, se puede usar el mapeo de epítipos para determinar la secuencia a la que se fija un anticuerpo anti-E-selectina. El mapeo de epítipos está disponible en el comercio a través de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). De manera alternativa, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede brindar información sobre epítipos deseables. Sobre la base de esta información, es posible cribar de manera competitiva anticuerpos para la fijación al mismo epítipo. Un enfoque para lograrlo es realizar estudios de competencia y competencia cruzada para hallar anticuerpos que compitan o que compitan de manera cruzada entre sí por la fijación a E-selectina, por ejemplo, los anticuerpos compiten por la fijación al antígeno.

[00111] Además, el epítipo al que se fija el anticuerpo anti-E-selectina se puede determinar en un cribado sistemático mediante el uso de péptidos superpuestos derivados la E-selectina (por ejemplo, una secuencia de E-selectina humana) y determinando la fijación del anticuerpo. De acuerdo con los ensayos de expresión del fragmento génico, el marco de lectura abierto que codifica la E-selectina puede

fragmentarse ya sea al azar o mediante construcciones genéticas específicas, y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de E-selectina con el anticuerpo que se desea evaluar. Los fragmentos génicos se pueden producir, por ejemplo, mediante PCR y luego transcribir y traducir en una proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La fijación del anticuerpo a los fragmentos de E-selectina etiquetados de manera radioactiva se determina mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel.

[00112] También se pueden identificar ciertos epítomos usando grandes colecciones de secuencias peptídicas aleatorias expresadas sobre la superficie de las partículas de fago (colecciones de fago) o levadura (expresión de levadura). De manera alternativa, una colección definida de fragmentos peptídicos superpuestos se puede evaluar para determinar la fijación al anticuerpo de prueba en ensayos de fijación simples. En otro ejemplo, se puede realizar mutagénesis de un antígeno, experimentos de intercambio de dominio y mutagénesis de rastreo de alanina, a fin de identificar los residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la fijación al epítomo.

[00113] Más en detalle, el epítomo para la interacción entre el antígeno y el anticuerpo se puede definir por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción entre antígeno y anticuerpo, así como la información sobre sus contribuciones relativas a la termodinámica de fijación. Más en detalle, el epítomo se puede caracterizar por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos entre antígeno y anticuerpo. Con menor detalle, el epítomo se puede caracterizar por los residuos de aminoácidos que comprende, según lo definido por un criterio específico, por ejemplo, la distancia entre los átomos (por ejemplo, átomos pesados, es decir, que no son de hidrógeno) en el anticuerpo y el antígeno. Con menor detalle, el epítomo se puede caracterizar por la función, por ejemplo, por la fijación competitiva con otros anticuerpos. El epítomo también puede definirse de manera más genérica como aquel que comprende residuos de aminoácidos en los cuales la sustitución con otro aminoácido alterará las características de la interacción entre el antígeno y el anticuerpo (por ejemplo, barrido de alanina).

[00114] Como las descripciones y definiciones de epítomos se obtienen con distintos niveles de detalle en función del método de mapeo de epítomos utilizado, se desprende que la comparación de epítomos para distintos anticuerpos en el mismo antígeno puede realizarse de manera similar con distintos niveles de detalle.

[00115] Se considera que los epítomos descritos en el nivel de aminoácidos, por ejemplo, los determinados a través de una cristalografía de rayos X,

espectroscopía por resonancia magnética nuclear (NMR), espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno/deuterio (H/D-MS), son idénticos si contienen el mismo conjunto de residuos de aminoácidos. Se considera que los epítomos se superponen si los epítomos comparten al menos un aminoácido. Se considera que los epítomos están separados (únicos) si los epítomos no comparten ningún residuo de aminoácido.

[00116] Aun otro método que se puede usar para caracterizar un anticuerpo anti-E-selectina consiste en usar ensayos de competencia (por ejemplo, los descritos en el Ejemplo 9 de la presente divulgación) con otros anticuerpos que se sabe que se fijan al mismo antígeno, a fin de determinar si un anticuerpo anti-E-selectina se fija al mismo epítomo que otros anticuerpos. Las personas del oficio de nivel medio conocen ensayos de competencia. Se considera que los epítomos caracterizados por la fijación competitiva se superponen si la fijación de los anticuerpos correspondientes es mutuamente exclusiva, es decir, la fijación de un anticuerpo excluye la fijación simultánea o consecutiva de otro anticuerpo. Se considera que los epítomos están separados (son únicos) si el antígeno puede adaptar la fijación de ambos anticuerpos correspondientes de manera simultánea.

[00117] Los epítomos pueden ser lineales o conformacionales. En un epítomo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula de interacción (tal como un anticuerpo) se producen de manera lineal a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. Un "epítomo no lineal" o "epítomo conformacional" comprende polipéptidos (o aminoácidos) no contiguos dentro de la proteína antigénica a la que se fija un anticuerpo específico del epítomo.

[00118] La afinidad de fijación de un anticuerpo puede expresarse como valor K_D , que se refiere a la velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. K_D es la relación entre la velocidad de disociación, también denominada "constante de disociación (k_{off})" o " k_d ", y la velocidad de asociación, también denominada "constante de asociación (k_{on})" o " k_a ". Por lo tanto, K_D es igual a k_{off}/k_{on} (o k_d/k_a) y se expresa como una concentración molar (M), y, cuanto menor es K_D , más fuerte es la afinidad de fijación. Los valores de K_D de los anticuerpos se pueden determinar con métodos establecidos en el estado de la técnica. Un método de ejemplo para medir K_D es mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), que por lo general utiliza un sistema biosensor, tal como un sistema BIACORE®. El análisis cinético BIAcore comprende el análisis de la fijación y la disociación de un antígeno desde chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden dominios de fijación a epítomo), en su superficie. Otro método para

determinar la K_D de un anticuerpo es a través de interferometría de biocapa, por lo general mediante tecnología OCTET (sistema Octet Qke, ForteBio). De manera alternativa o adicional, también se puede utilizar un ensayo KinExA (ensayo de exclusión cinética), disponible a través de Sapidyne Instruments (Boise, ID).

[00119] Un anticuerpo que "se fija preferentemente" o "se fija específicamente" (usados de manera indistinta en la presente) a un epítopo es una expresión comprendida en el estado de la técnica, y los métodos para determinar tal fijación específica o preferencial también son conocidos en el estado de la técnica. Se dice que una molécula (por ejemplo, una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo y similares) exhibe "fijación específica" o "fijación preferencial" si reacciona o se asocia con mayor frecuencia, de manera más rápida, con mayor duración y/o con mayor afinidad a una célula o sustancia particular en comparación con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se fija específicamente" o se "fija preferentemente" a una diana si se fija con mayor afinidad, avidez, facilidad y/o duración de lo que se fijaría a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se fija específica o preferentemente a un epítopo de E-selectina es un anticuerpo que se fija a un epítopo particular con mayor afinidad, avidez, facilidad y/o duración de lo que se fijaría a otros epítopos de E-selectina o epítopos que no son de E-selectina, incluso epítopos de P-selectina y/o L-selectina. Por lo tanto, en las condiciones de ensayo designadas, la porción de fijación específica (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este, o un receptor o fragmento de fijación al ligando de este) se fija preferentemente a una molécula diana particular y no se fija a otros componentes presente en una prueba de muestra en una cantidad significativa. En general, pero no necesariamente, la referencia a la fijación significa fijación preferencial.

[00120] Se pueden usar diversos formatos de ensayo para seleccionar un anticuerpo o péptido que se fija específicamente a una molécula de interés. Por ejemplo, el inmunoensayo ELISA en fase sólida (que incluye ELISA de fijación competitiva), el inmunoensayo AlphaLISA® (Perkin-Elmer), la inmunoprecipitación, BIAcore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ), la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), Octet™ (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA) y el análisis de transferencia Western se encuentran entre los diversos ensayos que se pueden usar para identificar un anticuerpo que reacciona específicamente con un antígeno o un receptor, o fragmento de fijación al ligando de este, que se fija específicamente a un componente de fijación o ligando cognado. En general, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal o ruido de fondo y, más en general, más

de 10 veces el fondo, más de 50 veces el fondo, más de 1000 veces el fondo, o más. Se dice que un anticuerpo se "fija específicamente" a un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio (K_D) es $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 100 \text{ pM}$. En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina se fija a la E-selectina (por ejemplo, E-selectina humana) con una $K_D < 70 \text{ nM}$ (por ejemplo, $68,4 \pm 3,18 \text{ nM}$). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina se fija a la E-selectina (por ejemplo, E-selectina de *Macaca fascicularis*) con una $K_D < 68 \text{ nM}$ (por ejemplo, $64,9 \pm 1,13 \text{ nM}$).

[00121] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina se fija a E-selectina humana con una K_D seleccionada del grupo que consiste en alrededor de $92,85 \text{ nM}$, alrededor de $70,3 \text{ nM}$, alrededor de $65,2 \text{ nM}$, alrededor de $61,8 \text{ nM}$, alrededor de $60,5 \text{ nM}$, alrededor de $68,0 \text{ nM}$, alrededor de $21,6 \text{ nM}$, alrededor de 324 nM , alrededor de $54,4 \text{ nM}$, alrededor de $628,5 \text{ nM}$ y 2940 nM . En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina se fija a E-selectina de *Macaca fascicularis* con una K_D seleccionada del grupo de alrededor de $138,5 \text{ nM}$, alrededor de $78,3 \text{ nM}$, alrededor de $76,5 \text{ nM}$, alrededor de $81,5 \text{ nM}$, alrededor de $67,8 \text{ nM}$, alrededor de $45,8 \text{ nM}$, alrededor de $243,5 \text{ nM}$, alrededor de $45,4 \text{ nM}$, alrededor de 492 nM y 3145 nM .

[00122] El término "competir", como se usa en la presente con respecto a un anticuerpo, significa que la fijación de un primer anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, a un antígeno reduce la fijación posterior al mismo antígeno de un segundo anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno este. De manera alternativa, es posible que la fijación del segundo anticuerpo a un antígeno también disminuya de manera detectable en presencia del primer anticuerpo, pero no es necesariamente el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la fijación de un segundo anticuerpo a un antígeno sin que ese segundo anticuerpo inhiba la fijación del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de manera detectable la fijación del otro anticuerpo a su ligando o epítipo cognado, ya sea en menor, igual o mayor grado, se dice que los anticuerpos "compiten de manera cruzada" entre sí por la fijación de sus epítipos respectivos. La presente invención abarca tanto anticuerpos que compiten como anticuerpos que compiten de manera cruzada. Independientemente del mecanismo mediante el cual se produce la competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o fijación a un epítipo común o fragmento de este), las personas del oficio de nivel medio apreciarán, en función de las enseñanzas proporcionadas en la presente, que tales anticuerpos que compiten y/o que compiten de manera cruzada

están abarcados y pueden ser útiles para los métodos divulgados en la presente.

[00123] Se pueden usar ensayos de competencia estándar para determinar si dos anticuerpos compiten entre sí. Un ensayo adecuado para la competencia de anticuerpos implica el uso de tecnología Biacore, que puede medir el alcance de las interacciones mediante el uso de tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR), que por lo general utiliza un sistema biosensor (tal como un sistema BIACORE). Por ejemplo, SPR puede utilizarse para un ensayo de inhibición de fijación competitiva *in vitro* para determinar la capacidad de un anticuerpo de inhibir la fijación de un segundo anticuerpo. Otro ensayo para medir la competencia de anticuerpos utiliza el enfoque basado en ELISA.

[00124] Además, un proceso de alto rendimiento para "caracterizar" anticuerpos en función de su competencia se describe en la solicitud de patente internacional N.º WO2003/48731. Hay competencia si un anticuerpo (o fragmento) reduce la fijación de otro anticuerpo (o fragmento) a la E-selectina. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de competencia de fijación secuencial, en el que se agregan anticuerpos diferentes de manera secuencial. Puede agregarse el primer anticuerpo para alcanzar una fijación cercana a la saturación. Luego, se agrega el segundo anticuerpo. Si no se detecta la fijación del segundo anticuerpo a la E-selectina, o si esta se encuentra reducida de manera significativa (por ejemplo, una reducción de al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 20 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %) en comparación con un ensayo paralelo en ausencia del primer anticuerpo (cuyo valor puede establecerse en 100 %), se considera que los dos anticuerpos compiten entre sí.

[00125] La definición del término "parátipo" deriva de la definición anterior de "epítipo", pero en sentido contrario. Por lo tanto, el término "parátipo" se refiere a un área o región en el anticuerpo que se fija específicamente a un antígeno, es decir, a los residuos de aminoácidos en el anticuerpo que entran en contacto con el antígeno (E-selectina, o un fragmento de esta), según la definición de "contacto" en otra parte de la presente. El parátipo de un par determinado de anticuerpo/antígeno se puede identificar mediante métodos de rutina. Por ejemplo, el anticuerpo y la molécula diana se pueden combinar, y el complejo anticuerpo/antígeno se puede cristalizar. La estructura de cristal del complejo se puede determinar y usar para identificar sitios de interacción específicos entre el anticuerpo y su diana.

[00126] En algunas formas de realización, el anticuerpo es una "variante de anticuerpo". Una variante de anticuerpo puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30 o más sustituciones y/o eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos de las secuencias y fragmentos específicos divulgados en la presente, y en particular en la Tabla 2. Las variantes de "eliminación" pueden comprender la eliminación de aminoácidos individuales, la eliminación de pequeños grupos de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o la eliminación de regiones de aminoácidos más grandes, tal como la eliminación de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "inserción" pueden comprender la inserción de aminoácidos individuales, la inserción de pequeños grupos de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o la inserción de regiones de aminoácidos más grandes, tal como la inserción de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "sustitución" implican preferentemente el reemplazo de uno o más aminoácidos con la misma cantidad de aminoácidos y la realización de sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, un aminoácido se puede sustituir con un aminoácido alternativo que tenga propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático.

[00127] A las variantes de sustitución se les retira al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo y se les inserta un residuo diferente en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de marco. Se muestran sustituciones conservadoras en la Tabla 1. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio de actividad biológica, se pueden introducir entonces cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" y mostrados a continuación, o como se describe adicionalmente más adelante en relación con las clases de aminoácidos, y los productos pueden analizarse.

TABLA 1
Aminoácidos y sustituciones

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones de ejemplo
alanina Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
arginina Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
asparagina Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones de ejemplo
ácido aspártico Asp (D)	Glu	Glu; Asn
cisteína Cys (C)	Ser	Ser; Ala
glutamina Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
glutámico Glu (E)	Asp	Asp; Gln
glicina Gly (G)	Ala	Ala
histidina His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
isoleucina Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
leucina Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
lisina Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
metionina Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
fenilalanina Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
prolina Pro (P)	Ala	Ala
serina ser (S)	Thr	Thr
treonina Thr (T)	Ser	Ser
triptófano Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
tirosina Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
valina val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

[00128] Las modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo se logran mediante la selección de sustituciones que difieren considerablemente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación helicoidal o laminar beta, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en función de las propiedades comunes de la cadena lateral:

- i. No polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- ii. Polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- iii. Ácido (carga negativa): Asp, Glu;
- iv. Básico (carga positiva): Lys, Arg;
- v. Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- vi. Aromático: Trp, Tyr, Phe, His.

[00129] Las sustituciones no conservadoras se obtienen intercambiando un miembro de una de estas clases por otra clase.

[00130] Por ejemplo, un tipo de sustitución que se puede realizar es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que puede ser químicamente reactivo, por otro residuo, tal como, entre otros, alanina o serina. Por ejemplo, puede haber una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución se puede realizar en una CDR o región de marco de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo.

En algunas formas de realización, la cisteína es canónica. También se puede sustituir cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación correcta del anticuerpo, por lo general, con serina, a fin de mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. Por el contrario, se pueden agregar enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, en particular, cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv.

[00131] En un proceso conocido como "atravesamiento de la línea germinal", determinados aminoácidos en las secuencias VH y VL pueden mutar para coincidir con los que se encuentran naturalmente en las secuencias VH y VL de la línea germinal. En particular, las secuencias de aminoácidos de las regiones de marco en las secuencias VH y VL pueden mutar para coincidir con las secuencias de la línea germinal, a fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando se administra el anticuerpo. Como se usa en la presente, la expresión "línea germinal" se refiere a las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos de los genes y segmentos de genes del anticuerpo a medida que pasan de los parentales a la progenie a través de las células germinales. Esta secuencia de la línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en linfocitos B maduros que se alteraron mediante eventos de recombinación e hipermutación durante la maduración del linfocito B. Un anticuerpo que "utiliza" una línea germinal particular tiene una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que se alinea más cercanamente con la secuencia de nucleótidos de esa línea germinal o con la secuencia de aminoácidos que especifica. Con frecuencia, tales anticuerpos están mutados en comparación con la secuencia de la línea germinal. En el estado de la técnica se conocen secuencias de ADN de la línea germinal para genes VH y VL humanos (ver, por ejemplo, la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "Vbase"; ver también Kabat, E. A., *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH N.º 91-3242; Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1992; 227:776-798; y Cox *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 1994; 24:827-836).

Anticuerpos contra E-selectina

[00132] La divulgación proporciona anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, que se fijan a la E-selectina. La E-selectina es también conocida como el miembro E de la familia de similares al antígeno CD62 (CD62E), la molécula 1 de adhesión leucocitaria al endotelio (ELAM-1) o la molécula 2 de adhesión de leucocitos y células endoteliales (LECAM2).

[00133] Como se usa en la presente, el término "E-Selectina" incluye variantes,

isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos de la E-selectina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, divulgado en la presente reacciona de forma cruzada con la E-selectina de especies no humanas, tal como E-selectina de *Macaca fascicularis*, así como diferentes formas de E-selectina. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede ser completamente específico para E-selectina humana y puede no exhibir reactividad cruzada entre especies (por ejemplo, no se fija a la E-selectina de ratón) u otros tipos de reactividad cruzada (por ejemplo, no se fija a P-selectina y/o L-selectina). Como se usa en la presente, el término E-selectina se refiere a E-selectina humana natural a menos que el contexto indique lo contrario. Por lo tanto, "anticuerpo contra E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este", "anticuerpo anti- E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este" u otra designación similar significa cualquier anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este (como se define en la presente) que se asocia, fija o reacciona de manera específica y/o preferente con E-selectina, una isoforma, fragmento o derivado de esta. La forma madura de longitud completa de E-selectina humana, representada por el número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot P16581 (aminoácidos 22-610), se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 132. La forma madura de longitud completa de E-selectina de ratón, representada por el número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot Q00690 (aminoácidos 22-612), se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 134. La forma madura de longitud completa de E-selectina de *Macaca fascicularis*, representada por el número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot G8F370 (aminoácidos 22-610), se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 201.

[00134] La E-selectina se expresa en células endoteliales, la L-selectina se expresa de manera constitutiva en microvellosidades de leucocitos, y la P-selectina se almacena en los gránulos α de plaquetas y cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales (Tedder *et al.*, FASEB J. 1995; 9:866-873; Kanas *et al.*, Blood 1996; 88:3259-3287). Todas se fijan a las estructuras de carbohidratos con un determinante sialil Lewis (sLex) en glucoproteínas o glucolípidos (Chase *et al.*, Ann. Biomed. Eng. 2012; 40(4):849-885). Las P- y L-selectinas también requieren sulfatación en el ligando para una fijación óptima, mientras que la fijación de E-selectina a ligandos es más permisiva y requiere únicamente determinantes sialil Lewis. El ligando 1 de glucoproteína de P-selectina (PSGL-1) se expresa en leucocitos y se fija a todas las selectinas. La E-selectina también interactúa con ligandos que incluyen el ligando de L-selectina, CD44, y el ligando 1 de E-selectina (ESL-1)(Chase *et al.*, Ann. Biomed.

Eng. 2012; 40(4):849-885; Hidalgo *et al.*, Immunity 2007; 26(4):477-489).

[00135] La expresión de E-selectina por células endoteliales requiere una síntesis de proteínas nueva en respuesta a la hipoxia o un estímulo inflamatorio. La E-selectina es fundamental para la adherencia de los neutrófilos al endotelio y para la generación de ondas de señales de activación en el endotelio que producen una expresión polarizada de la integrina $\alpha\text{M}\beta 2$ activada (Hidalgo *et al.*, Nat. Med. 2009; 15:384-391; Pruenster *et al.*, Nat. Commun. 2015; 6:6915; Manwani y Frenette, Blood 2014; 122:3892-3898). Los ratones con deficiencia de E-selectina no exhiben un fenotipo obvio distinguible de los ratones de tipo silvestre (Labow *et al.*, Immunity 1994; 1:709-720).

[00136] Además de la E-selectina de células endoteliales, se encuentra en circulación la E-selectina soluble (sE-selectina). El mecanismo de liberación de sE-selectina en la circulación puede ser mediante escisión enzimática o resultar del desprendimiento de células endoteliales activadas o dañadas; sin embargo, no se conoce el mecanismo preciso (Roldán *et al.*, Thromb. Haemost. 2003; 90:1007-1020). La concentración de sE-selectina parece relacionarse con su expresión en la superficie de las células endoteliales, por ende, la concentración de sE-selectina de plasma podría ser un marcador del daño o activación de las células endoteliales (Leeuwenberg *et al.*, Immunology 1992; 77(4):543-549; Roldán *et al.*, Thromb. Haemost. 2003; 90:1007-1020). Se han encontrado mayores valores de los niveles de E-selectina soluble en circulación en varias condiciones patológicas que incluyen la hipertensión, diabetes e hiperlipidemia (Roldán *et al.*, Thromb. Haemost. 2003; 90:1007-1020). Kato *et al.* estudiaron 160 pacientes con SCD y 41 individuos de control y encontraron que la E-selectina soluble estaba considerablemente elevada en comparación con los controles (mediana de 74,6, 41,5 ng/ml, $p < 0,001$) (British J. Haem. 2005; 130:943-953). Los niveles leves y moderados de hipertensión pulmonar se asociaron significativamente con la concentración lineal de sE-selectina y tuvieron un mayor riesgo relativo de mortalidad temprana en pacientes con SCD (RR de 4,2; 95 % CI 2,0, 8,9) (Kato *et al.*).

[00137] Preferentemente, los anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, de la presente divulgación se fijan a la E-selectina pero no se fijan, o se fijan con menor afinidad, a otras selectinas (por ejemplo, P-selectina, L-selectina). En algunas formas de realización, los anticuerpos, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, de la presente divulgación se fijan específicamente a la E-selectina, y, con mayor preferencia, se fijan específicamente a la E-selectina humana y/o de *Macaca*

fascicularis. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, así como usos de tales anticuerpos, incluso usos terapéuticos y farmacéuticos.

[00138] Un anticuerpo anti-E-selectina, preferentemente, un anticuerpo de gran afinidad (por ejemplo, un anticuerpo específico), puede ser eficaz en el sistema vascular y en múltiples compartimentos de tejidos, donde la E-selectina se expresa en la superficie de células endoteliales, o se encuentra en forma soluble, y se cree que interactúa con células diana (por ejemplo, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos similares a T efector de memoria, células *natural killer*, células mieloides) que expresan ligandos de E-selectina. Los anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, de la divulgación tienen el potencial de inhibir la fijación de la E-selectina a ligandos, incluso, por ejemplo, glucoproteínas o glucolípidos con un determinante sialil Lewis (sLex) (por ejemplo, tetrasacárido sialil Lewis x α 2,3 sialilado y α 1,3 o α 1,4 fucosilado), determinante sialil Lewis A, ligando 1 de E-selectina (ESL-1), L-selectina, CD44, ligando 1 de glucoproteína de P-selectina (PSGL-1), proteína de membrana asociada a lisosoma 1 (LAMP1), proteína de membrana asociada a lisosoma 2 (LAMP2), receptor de muerte 3 (DR3) e integrina α M β 2 (CD11b/CD18; Mac-1) (Chase *et al.*, *Annals Biomed. Engin.* 2012; 40(4): 849-859). Sin limitarse a ninguna teoría en particular, el bloqueo de la interacción del ligando celular de E-selectina inhibe la adherencia de leucocitos (por ejemplo, neutrófilos) al endotelio, lo que evita que los agregados celulares bloqueen el flujo sanguíneo y produzcan VOC.

[00139] Un anticuerpo "neutralizante" o "de bloqueo" se refiere a un anticuerpo cuya fijación a E-selectina (i) interfiere con, limita o inhibe la interacción entre E-selectina, o un fragmento de E-selectina, y un ligando de E-selectina, tal como un determinante sLex; y/o (ii) da como resultado la inhibición de al menos una función biológica de la fijación a E-selectina. Los ensayos para determinar la neutralización por parte de un anticuerpo de la divulgación se describen en otra parte en la presente y se conocen en el estado de la técnica.

[00140] "Función biológica" o "actividad biológica" de E-selectina pretende incluir unión de leucocitos, rodamiento lento y activación de la adhesión estable de leucocitos a células endoteliales, señalización de extravasación selectiva y eficiente en sitios de inflamación. "Función biológica" o "actividad biológica" de E-selectina incluye mediar un aumento de: afinidad y avidéz de integrinas CD18 para soportar la desaceleración y el tráfico de PMN a sitios de inflamación aguda, calcio citosólico, fosforilación de tirosina para activar p38 MAP quinasa y Syk quinasa, entre otros

conocidos actualmente en el estado de la técnica o identificados en el futuro. La función biológica o actividad biológica de E-selectina puede ser mediada por la interacción entre E-selectina y sus ligandos, aunque no es necesario.

[00141] La divulgación incluye un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que puede modular una actividad biológica de E-selectina. Es decir, la invención incluye un anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a la E-selectina y modula al menos una actividad detectable de E-selectina de modo que el anticuerpo: (a) disminuye la unión de leucocitos a células endoteliales; (b) disminuye la activación de la adhesión estable a las células endoteliales; (c) reduce el rodamiento lento de los leucocitos hasta detenerse; (d) reduce la migración transendotelial eficaz de los leucocitos; (e) disminuye la afinidad y avidéz de las integrinas CD18; (f) reduce el tráfico de leucocitos a sitios de inflamación aguda; (g) disminuye el calcio citosólico; (h) disminuye la fosforilación de tirosina que activa p38 MAP quinasa y Syk quinasa; (i) reduce el reclutamiento de plaquetas y leucocitos de la sangre al endotelio vascular; y/o (j) no crea un entorno proinflamatorio.

[00142] La actividad biológica de E-selectina se puede evaluar en ensayos de fijación y neutralización estática *in vitro* mediante el uso de E-selectina (por ejemplo, E-selectina soluble o células CHO que expresan E-selectina) y un ligando (por ejemplo, ligando sialil Lewis soluble o ligando expresado en la superficie celular (por ejemplo, en células HL-60)). La fijación de E-selectina también se puede evaluar mediante el uso de proteínas solubles o expresadas en la superficie celular en ensayos de flujo fisiológico conocidos en el estado de la técnica e indicados en la sección de Ejemplos de la presente divulgación. La capacidad de los anticuerpos neutralizantes para prevenir la fijación de E-selectina también se puede evaluar al incubar células que expresan E-selectina (por ejemplo, humana, de *Macaca fascicularis*) con un ligando de E-selectina soluble (antígeno sialil Lewis) o expresado en la superficie celular (por ejemplo, en células HL-60, HUVEC, CLMEC) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este.

[00143] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina de la divulgación abarca un anticuerpo que compite por la fijación a E-selectina humana con, y/o se fija al mismo epítipo que, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que tiene la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de

una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 5.

[00144] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, de la divulgación abarca un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que inhibe o reduce la fijación de E-selectina a al menos un ligando de E-selectina (por ejemplo, glucoproteínas o glucolípidos con un determinante sialil Lewis (sLex) (por ejemplo, tetrasacárido sialil Lewis x α 2,3 sialilado y α 1,3 o α 1,4 fucosilado), determinante sialil Lewis A, ESL-1, L-selectina, CD44, PSGL-1, LAMP1, LAMP2, DR3 e integrina α M β 2 (CD11b/CD18; Mac-1)).

[00145] En algunas formas de realización, la divulgación abarca un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que compite con un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que tiene la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada establecida como SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana establecida como SEQ ID NO: 5, en la inhibición de la fijación de E-selectina con un ligando.

[00146] En algunas formas de realización, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este de la divulgación, incluye una región constante de la cadena pesada de IgG1, por ejemplo, una cadena pesada anti-E-selectina establecida como SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13 (sin lisina del terminal C). En algunas formas de realización, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, incluye una región constante de la cadena liviana kappa, por ejemplo, una cadena liviana anti-E-selectina establecida como SEQ ID NO: 1.

[00147] Los anticuerpos anti-E-selectina de la presente divulgación pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, monocatenarios (ScFv), mutantes de estos, proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluso variantes de glucosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados de manera covalente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (incluso anticuerpos quiméricos o humanizados). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina es un anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina es un anticuerpo humano o humanizado. En algunas formas de realización,

un anticuerpo anti-E-selectina es un anticuerpo quimérico.

[00148] La Tabla 2 proporciona secuencias de aminoácidos y nucleótidos para los anticuerpos anti-E-selectina quiméricos y humanizados como se describen en la presente. En general, a menos que se indique específicamente, los anticuerpos anti-E-selectina de la divulgación pueden incluir cualquier combinación de una o más CDR. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-E-selectina de la divulgación pueden incluir cualquier combinación de una o más secuencias de VH y/o VL como se establecen en la Tabla 2, con anticuerpos particulares definidos por SEQ ID NO: en la Tabla 3. Las CDR de las VH y VL anti-E-selectina se definieron mediante la definición de Kabat con la H1 extendida. Para HCDR-1, el último residuo incluye cualquier inserto antes de la posición H36 (es decir, H35a, H35b, H35c, etc.). Las CDR se definieron de la siguiente manera: HCDR-1 (H26 a H35c), HCDR-2 (H50 a H65), HCDR-3 (H95 a H102), LCDR-1 (L24 a L34), LCDR-2 (L50 a L56) y LCDR-3 (L89 a L87).

[00149] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende un dominio HC, LC, VL y/o VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende un dominio HC, LC, VL y/o VH codificado por una secuencia de ácidos nucleicos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos de la Tabla 2.

[00150] Tabla 2. Secuencias de péptidos de E-selectina, anticuerpos anti-E-selectina y fragmentos de estos.

SEQ	Descripción	Secuencia
1	1444_optimized_L (LC)	DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCKTSQNIE RYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ DNAWPLTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
2	1444_optimized_L CDR_L1	KTSQNIERYL N
3	1444_optimized_L CDR_L2	AASSLQS
4	1444_optimized_L CDR_L3	LQDNAWPLT

5	1444_optimized_L FV_L (VL)	DIQMTQSPSS RYLNWYQQKP RFSGSGSGTD DNAWPLTFGQ	LSASVGDRVIT GKAPKLLIYA FTLTISSLQP GTKVEIK	ITCKTSQNIASSLQSGVPS EDFATYFCLQ
6	1444_optimized_L FW_L4	FGQGTKVEIK		
7	1444_optimized_H (HC) (with C-terminal lysine(K))	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SAYMHWVRQA VDSVTGRFTI TAVYYCAML KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVTVPS VDKKVEPKSC FLFPPKPKDT PEVKFNWYVD RVVSVLTVLH PIEKTISKAK NQVSLTCLVK YKTTTPVLDS NVFSCSVME	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAR SADNAKNSAY YSTSEYWGQG GALTSGVHTF PAVLQSSGLY NVNHKPSNTK APEAAGAPSV CVVVDVSHED PREEQYNSTY CKVSNKALPA LPPSREEMTK WESNGQPENN TVDKSRWQQG ALHNHYTQKS	SCAASGYAIR IDPANGNTIY LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVNHKPSNTK APEAAGAPSV CVVVDVSHED PREEQYNSTY CKVSNKALPA LPPSREEMTK WESNGQPENN TVDKSRWQQG LSLSPGK
8	1444_optimized_H CDR_H1	GYAIRSAYMH		
9	1444_optimized_H CDR_H2	RIDPANGNTI YVDSVTG		
10	1444_optimized_H CDR_H3	DLYSTSEY		
11	1444_optimized_H FV_H (FV)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SAYMHWVRQA VDSVTGRFTI TAVYYCAML	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAR SADNAKNSAY YSTSEYWGQG	SCAASGYAIR IDPANGNTIY LQMNSLRAED TLVTVSS
12	1444_optimized_H FW_H4	WGQGTTLVTVS S		
13	1444_optimized_H (HC) (sin lisina del terminal C (K))	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SAYMHWVRQA VDSVTGRFTI TAVYYCAML KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVTVPS VDKKVEPKSC FLFPPKPKDT PEVKFNWYVD RVVSVLTVLH PIEKTISKAK NQVSLTCLVK YKTTTPVLDS NVFSCSVME	LVQPGGSLRL PGKGLEWVAR SADNAKNSAY YSTSEYWGQG GALTSGVHTF PAVLQSSGLY NVNHKPSNTK APEAAGAPSV CVVVDVSHED PREEQYNSTY CKVSNKALPA LPPSREEMTK WESNGQPENN TVDKSRWQQG ALHNHYTQKS	SCAASGYAIR IDPANGNTIY LQMNSLRAED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVNHKPSNTK APEAAGAPSV CVVVDVSHED PREEQYNSTY CKVSNKALPA LPPSREEMTK WESNGQPENN TVDKSRWQQG LSLSPG
14	1444_optimized_L CL	RTVAAPSVFI NFYPREAKVQ SKDSTYSLSS HQGLSPVTK	FPPSDEQLKS WKVDNALQSG TLTLKADYE SFNRGEC	GTASVVCLLN NSQESVTEQD KHKVYACEVT
15	1444_optimized_H CH (con lisina del terminal C	ASTKGPSVFDPYFPEPVTVS	LAPSSKSTSG WNSGALTSGV	GTAALGCLVK HTFPAVLQSS

	(K))	GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGA PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
16	1444_optimized _H CH (sin lisina del terminal C (K))	ASTKGPSVFAP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGA PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
17	0841_humanized1_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKTSQNIN RYLNWYQQKP GKAPKLLIYN ANSLQTVGPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ DNSWPLTFGQ GTKVEIKRTV AAPS VFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE
18	0841_humanized1_L CDR_L1	KTSQNINRYL N
19	0841_humanized1_L CDR_L2	NANSLQT
20	0841_humanized1_L CDR_L3	LQDNSWPLT
21	0841_humanized1_L FV_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKTSQNIN RYLNWYQQKP GKAPKLLIYN ANSLQTVGPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ DNSWPLTFGQ GTKVEIK
22	0841_humanized1_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYNIR SSYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY AEKFKIRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMDL YSTSEYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHNKPSNTK VDKKEPKSC DKHTCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNATK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDI AVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

23	0841_humanized1_H CDR_H1	GYNIRSSYM
24	0841_humanized1_H CDR_H2	RIDPANGNTI YAEKFKI
25	0841_humanized1_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYNIR SSYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY AEKFKIRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMDL YSTSEYWGQG TLVTVSS
26	0978_humanized2_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKTSQNIN RYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ DNSWPLTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE
27	0978_humanized2_L FV_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKTSQNIN RYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ DNSWPLTFGQ GTKVEIK
28	0978_humanized2_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYNIR SSYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VDSVKGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMDL YSTSEYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKEPKSC DKHTCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG
29	0978_humanized2_H CDR_H2	RIDPANGNTI YVDSVKG
30	0978_humanized2_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYNIR SSYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VDSVKGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMDL YSTSEYWGQG TLVTVSS
31	0164_chimera_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRVT INCKTSQNIN RYLNWYQQKL GEAPKLLIYN ANSLQTGIPS RFSASGSGTD FTLTINSLQP EDVATYFCLQ DNSWPLTFGS GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE
32	0164_chimera_L FV_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRVT INCKTSQNIN RYLNWYQQKL GEAPKLLIYN ANSLQTGIPS RFSASGSGTD FTLTINSLQP EDVATYFCLQ DNSWPLTFGS GTKLEIK

33	0164_chimera_L FW_L4	FGSGTKLEIK
34	0164_chimera_H	EVQLQQSGAE FGKPGTSVKL SCKVSGYNIR SSYMHWWVNQR PGKGLEWIGR IDPANGNTIY AEKFKIKAIL TADSSSNTAY MQLSQLKSDD TAIYFCAMD L YSTSEYWGQG VMVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
35	0164_chimera_H FV_H	EVQLQQSGAE FGKPGTSVKL SCKVSGYNIR SSYMHWWVNQR PGKGLEWIGR IDPANGNTIY AEKFKIKAIL TADSSSNTAY MQLSQLKSDD TAIYFCAMD L YSTSEYWGQG VMVTVSS
36	0164_chimera_H FW_H4	WGQGVMTVS S
37	1448_optimized_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYAIR SAYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VDSVKERFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMD L YSTSEYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
38	1448_optimized_H CDR_H2	RIDPANGNTI YVDSVKE
39	1448_optimized_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYAIR SAYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VDSVKERFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMD L YSTSEYWGQG TLVTVSS
40	1284_optimized_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYAIR SAYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VESVEGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMD L YSTSEYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

		PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
41	1284_optimized_H CDR_H2	RIDPANGNTI YVESVEG
42	1284_optimized_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYAIR SAYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VESVEGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMDL YSTSEYWGQG TLVTVSS
43	1282_optimized_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYAIR SAYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VDSVEGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMDL YSTSEYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
44	1282_optimized_H CDR_H2	RIDPANGNTI YVDSVEG
45	1282_optimized_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYAIR SAYMHWRQA PGKGLEWVAR IDPANGNTIY VDSVEGRFTI SADNAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAMDL YSTSEYWGQG TLVTVSS
46	0525_humanized_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQTVG INVDWYQQKP GKAPKLLIYG ASNRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYCCCLQ YGSIPHTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE
47	0525_humanized_L CDR_L1	KASQTVGINV D
48	0525_humanized_L CDR_L2	GASNRHT
49	0525_humanized_L CDR_L3	LQYGSIPHT
50	0525_humanized_L FV_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQTVG INVDWYQQKP GKAPKLLIYG ASNRHTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYCCCLQ YGSIPHTFGQ GTKVEIK
51	0525_humanized_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLT GYMQWVRQA PGKGLEWMGF IRSSGSTEYN SEFKSRFTIS RDNANKSVYL QMNSLRAEDT AVYYCARCPY KYSSFVYGVG MDAWGQGTLV

		TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVVDK KVEPKSCDKT HTCPCCPAPE AAGAPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTV KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG
52	0525_humanized_H CDR_H1	GFSLTGYYMQ
53	0525_humanized_H CDR_H2	FIRSSGSTY NSEFKS
54	0525_humanized_H CDR_H3	CPYKYSSFVY VGVMDA
55	0525_humanized_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLT GYMQWVRQA PGKGLEWMGF IRSSGSTYEN SEFKSRFTIS RDNAKNSVYL QMNSLRAEDT AVYYCARCPY KYSSFVYVGV MDAWGQGTLLV TVSS
56	0039_chimera_L	EIVMTQSPTS MSTSIGERTV LNCKASQTVG INVDWYQQTP GQPPKLLIYG ASNRHTGVPD RFTGSGFGRD FTLTISNVEA EDLAVYCCLQ YGSIPHTFGP GTKLELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
57	0039_chimera_L FV_L	EIVMTQSPTS MSTSIGERTV LNCKASQTVG INVDWYQQTP GQPPKLLIYG ASNRHTGVPD RFTGSGFGRD FTLTISNVEA EDLAVYCCLQ YGSIPHTFGP GTKLELK
58	0039_chimera_L FW_L4	FGPGTKLELK
59	0039_chimera_H	QVQLKETGPG LVQPTQTLSI TCTVSGFSLT GYMQWVRQT PGKGLEWMGF IRSSGSTYEN SEFKSRLSIS RDTSKNQVFL KMNSLKTEDT GVYYCARCPY KYSSFVYVGV MDAWGQGAPV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVVDK KVEPKSCDKT HTCPCCPAPE AAGAPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTV KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
60	0039_chimera_H FV_H	QVQLKETGPG LVQPTQTLSI TCTVSGFSLT

		GYMQWVRQT PGKGLEWMGF IRSSGSTEYN SEFKSRLSIS RDTSKNQVFL KMNSLKTEDT GVYYCARCPY KYSSFVYVGV MDAWQGAPV TVSS
61	0039_chimera_H FW_H4	WGQGAPVTVS S
62	0265_0254_humanized_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFSIS TYNVHWLRQA PGKGLEWMGM MWSGGSPDYN SALKSRFTIS RDTAKNSVYL QMNSLRAEDT AVYYCARWGG GFDYWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP EAAGAPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPG
63	0265_0254_humanized_H CDR_H1	GFSISTYNVH
64	0265_0254_humanized_H CDR_H2	MMWSGGSPDY NSALKS
65	0265_0254_humanized_H CDR_H3	WGGGFDY
66	0265_0254_humanized_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFSIS TYNVHWLRQA PGKGLEWMGM MWSGGSPDYN SALKSRFTIS RDTAKNSVYL QMNSLRAEDT AVYYCARWGG GFDYWGQGT VTVSS
67	0265_0254_humanized_L	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASHSIG TNLHWYQQKP GKAPKLLIYF TSQSISGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TQSWPLTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
68	0265_0254_humanized_L CDR_L1	RASHSIGTNL H
69	0265_0254_humanized_L CDR_L2	FTSQSIS
70	0265_0254_humanized_L CDR_L3	QQTQSWPLT
71	0265_0254_humanized_L FV_L	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASHSIG TNLHWYQQKP GKAPKLLIYF TSQSISGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TQSWPLTFGQ GTKVEIK
72	0158_chimera_L	DIVLTQSPPT LSVTPGETVS LSCRASHSIG TNLHWYQQKT NESPRLLIKF TSQSISGIPS RFSASGSGTD FTLNINNVEF DDVSSYFCQQ TQSWPLTFGS GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV

		DNALQSGNSQ LSKADYEKHK RGE	ESVTEQDSKD VYACEVTHQG	STYSLSSTLT LSSPVTKSFN
73	0158_chimera_L FV_L	DIVLTQSPTT TNLHWYQQKT RFSASGSGTD TQSWPLTFGS	LSVTPGETVS NESPRLLIK FTLNINNVEF GTKLEIK	LSCRASHSIG TSQSISGIPS DDVSSYFCQQ
74	0158_chimera_H	QVQLKESGPG TYNVHWLRQP SALKSRLSIS TTYCARWGG PSVFPLAPSS PVTVSWNSGA SSVVTVPSSS KKVEPKSCDK FPPKPKDTLM VKFNWYVDGV VSVLTVLHQD EKTISKAKGQ VSLTCLVKGF TTPPVLDSDG FSCSVMEAL	LVQPSETLSL PGKGLEWMGM RDTSKNQVFL GFDYWGQGV KSTSGGTAAL LTSGVHTFPA LGTQTYICNV THTCPPCPAP ISRTPEVTCV EVHNAKTKPR WLNGKEYKCK PREPQVYTL YPSDIAVEWE SFFLYSKLTV HNHYTQKSLS	TCTVSGFSIS MWSGGSPDYN KMNSLQSEDT VTVSSASTKG GCLVKDYFPE VLQSSGLYSL NHKPSNTKVD EAAGAPSVFL VVDVSHEDPE EEQYNSTYRV VSNKALPAPI PSREEMTKNQ SNGQPENNYK DKSRWQQGNV LSPGK
75	0158_chimera_H FV_H	QVQLKESGPG TYNVHWLRQP SALKSRLSIS TTYCARWGG	LVQPSETLSL PGKGLEWMGM RDTSKNQVFL GFDYWGQGV	TCTVSGFSIS MWSGGSPDYN KMNSLQSEDT VTVSS
76	0929_0548_humanized_H	QVQLVQSGAE STYMHWRQA AEKFKRRVTL TAVYYCAMEV KGPSVFPLAP PEPVTVSWNS SLSSVVTVPS VDKKVEPKSC FLFPPKPKDT PEVKFNWYVD RVVSVLTVLH PIEKTISKAK NQVSLTCLVK YKTTTPVLDS NVFSCSVME	VKKPGASVKV PGQGLEWMGR TRDTSTSTAY RVSFEYWGQG SSKSTSGGTA GALTSGVHTF SSLGTQTYIC DKTHTCPPCP LMISRTPEVT GVEVHNAKTK QDWLNGKEYK GQPREPQVYT GFYPSDIAVE DGSFFLYSKL ALHNHYTQKS	SCKVSGYNIR IDPANGNTIY MELSSLRSED TLVTVSSAST ALGCLVKDYF PAVLQSSGLY NVNHKPSNTK APEAAGAPSV CVVVDVSHED PREEQYNSTY CKVSNKALPA LPPSREEMTK WESNGQPENN TVDKSRWQQG LSLSPG
77	0929_0548_humanized_H CDR_H1		GYNIRSTYMH	
78	0929_0548_humanized_H CDR_H2		RIDPANGNTI	YAEKFKR
79	0929_0548_humanized_H CDR_H3		EVRVSFEY	
80	0929_0548_humanized_H FV_H	QVQLVQSGAE STYMHWRQA AEKFKRRVTL TAVYYCAMEV	VKKPGASVKV PGQGLEWMGR TRDTSTSTAY RVSFEYWGQG	SCKVSGYNIR IDPANGNTIY MELSSLRSED TLVTVSS
81	0929_0548_humanized_L	DIQMTQSPSS KYLDWYQQKP	LSASVGDRVT GKAPKLLIYY	ITCKASQNIN TNNLHTGVPS

		RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCLQ HDSGYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
82	0929_0548_humanized_L CDR_L1	KASQNINKYL D
83	0929_0548_humanized_L CDR_L2	YTNNLHT
84	0929_0548_humanized_L CDR_L3	LQHDSGYT
85	0929_0548_humanized_L FV_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNIN KYLDWYQQKP GKAPKLLIYY TNNLHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCLQ HDSGYTFGQG TKVEIK
86	0159_chimera_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRVT INCKASQNIN KYLDWYQQKL GEGPKLLIYY TNNLHTGIPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDVATYFCLQ HDSGYTFGAG TKLELKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
87	0159_chimera_L FV_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRVT INCKASQNIN KYLDWYQQKL GEGPKLLIYY TNNLHTGIPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDVATYFCLQ HDSGYTFGAG TKLELK
88	0159_chimera_L FW_L4	FGAGTKLELK
89	0159_chimera_H	EVQLQQSGAE LGKPGTSVKL SCKVSGYNIR STYMHVWSQR PGKGLEWIGR IDPANGNTIY AEKFKRKATL TADTSSNTAY MQLSQLKSDD RAIYFCAMEV RVSFEYWGQG VMVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
90	0159_chimera_H FV_H	EVQLQQSGAE LGKPGTSVKL SCKVSGYNIR STYMHVWSQR PGKGLEWIGR IDPANGNTIY AEKFKRKATL TADTSSNTAY MQLSQLKSDD RAIYFCAMEV RVSFEYWGQG VMVTVSS
91	0955_0300_humanized_H	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKVSGYSIR STYMHVVRQA PGQGLEWMGR IDPANGNTIY AERFKNRVTL TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAVEI LGIFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF

		PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG
92	0955_0300_humanized_H CDR_H1	GYSIRSTYMH
93	0955_0300_humanized_H CDR_H2	RIDPANGNTI YAERFKN
94	0955_0300_humanized_H CDR_H3	EILGIFDY
95	0955_0300_humanized_H FV_H	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKVSGYSIR STYMHWRQA PGQGLEWMGR IDPANGNTIY AERFKNRVTI TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAVEI LGIFDYWGQG TLVTVSS
96	0955_0300_humanized_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNID KYLDWYQQKPK GKAPKLLMYN TNSLHTGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ HNSGYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
97	0955_0300_humanized_L CDR_L1	KASQNIDKYL D
98	0955_0300_humanized_L CDR_L2	NTNSLHT
99	0955_0300_humanized_L CDR_L3	LQHNSGYT
100	0955_0300_humanized_L FV_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNID KYLDWYQQKPK GKAPKLLMYN TNSLHTGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ HNSGYTFGQG TKVEIK
101	0170_chimera_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRVT INCKASQNID KYLDWYQQKL GEAPKLLMYN TNSLHTGIPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDVATYFCLQ HNSGYTFGAG TKLELKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
102	0170_chimera_L FV_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRVT INCKASQNID KYLDWYQQKL GEAPKLLMYN TNSLHTGIPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDVATYFCLQ HNSGYTFGAG TKLELK
103	0170_chimera_H	EVQLQQSGAE LGKPGTSVKL SCKVSGYSIR STYMHWNQR PGKGLEWVGR IDPANGNTIY AERFKNKATL TADTSSNTAY MQLSQLKSDD

		TAIYFCAVEI LGIFDYWGQG VMVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
104	0170_chimera_H FV_H	EVQLQQSGAE LGKPGTSVKL SCKVSGYSIR STYMHWNQR PGKGLEWVGR IDPANGNTIY AERFKNKATL TADTSSNTAY MQLSQLKSDD TAIYFCAVEI LGIFDYWGQG VMVTVSS
105	0564_humanized_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQHIN RYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ANNLTQGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ HNSWPNTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
106	0564_humanized_L CDR_L1	KASQHINRYL N
107	0564_humanized_L CDR_L2	DANNLQT
108	0564_humanized_L CDR_L3	LQHNSWPNT
109	0564_humanized_L FV_L	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQHIN RYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ANNLTQGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYFCLQ HNSWPNTFGQ GTKVEIK
110	0564_humanized_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYKIR SSYMHWRQA PGKGLEWIGR IDPANGNTIY GDKFKSRFTL SSDTAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAIDI GTTFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
111	0564_humanized_H CDR_H1	GYKIRSSYM
112	0564_humanized_H CDR_H2	RIDPANGNTI YGDKFKS

113	0564_humanized_H CDR_H3	DIGTTFDY
114	0564_humanized_H FV_H	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYKIR SSYMHWRQA PGKGLEWIGR IDPANGNTIY GDKFKSRFTL SSDTAKNSAY LQMNSLRAED TAVYYCAIDI GTTFDYWGQG TLVTVSS
115	0180_chimera_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRV T INCKASQHIN RYLNWYQQKL GEAPKLLIYD ANNLTGTGIPS RFGSGSGGTD FTLTISLQP EDVATYFCLQ HNSWPNTFGA GTKLELKR TV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
116	0180_chimera_L FV_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRV T INCKASQHIN RYLNWYQQKL GEAPKLLIYD ANNLTGTGIPS RFGSGSGGTD FTLTISLQP EDVATYFCLQ HNSWPNTFGA GTKLELKR
117	0180_chimera_H	EVQLQQSGAE LGKPGTSVKL SCKVSGYKIR SSYMHWNQR PGKGLEWIGR IDPANGNTIY GDKFKSKATL TSDTSSNTAY IQLSQLKSDD TAIYFCAIDI GTTFDYWGQG VMVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKEPKSC DKHTCPCP APEAAGAPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDNLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
118	0180_chimera_H FV_H	EVQLQQSGAE LGKPGTSVKL SCKVSGYKIR SSYMHWNQR PGKGLEWIGR IDPANGNTIY GDKFKSKATL TSDTSSNTAY IQLSQLKSDD TAIYFCAIDI GTTFDYWGQG VMVTVSS
119	0027_chimera_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRIT INCKTSQNIN RYLNWFQQKL GEPPKLLIYN ANSLQADIPS RFGSGSGGTD FTLTITSLQP EDVATYFCLQ HHFWPYTFGA GTKLELRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
120	0027_chimera_L CDR_L2	NANSLQA
121	0027_chimera_L CDR_L3	LQHFWPYT
122	0027_chimera_L FV_L	DIQMTQSPSF LSASVGDRIT INCKTSQNIN RYLNWFQQKL GEPPKLLIYN ANSLQADIPS RFGSGSGGTD FTLTITSLQP EDVATYFCLQ HHFWPYTFGA GTKLELR
123	0027_chimera_L FW_L4	FGAGTKLELR

124	0027_chimera_H	EVHLHQSGPE LGRPGSSVKI SCKASGYTFT DYVMNWVRQS PGQGLEWIGW INPEDYSFDS GEKFLERATL TAATSSNTVY IQLSGLTSDD TATYFCVRGG LPGDWFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGAP SVFLFPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
125	0027_chimera_H CDR_H1	GYTFTDYVMN
126	0027_chimera_H CDR_H2	WINPEDYSFD SGEKFLE
127	0027_chimera_H CDR_H3	GGLPGDWFAY
128	0027_chimera_H FV_H	EVHLHQSGPE LGRPGSSVKI SCKASGYTFT DYVMNWVRQS PGQGLEWIGW INPEDYSFDS GEKFLERATL TAATSSNTVY IQLSGLTSDD TATYFCVRGG LPGDWFAYWG QGTLVTVSS
129	1444_L secuencia líder	MGWSCIIILFL VATATGVHS
130	1444_H secuencia líder	MEWSWVFLFF LSVTTGVHS
131	0164_chimera_L secuencia líder	MGWSCIIILFL VATATGAHS
132	E-selectina humana (residuos de aminoácidos 22-610 de la secuencia de UniProtKB P16581)	WSYNTSTEAM TYDEASAYCQ QRYTHLVAIQ NKEEIEYLNS ILSYSPSYW IGIRKVNNVW VWVGTTQKPLT EEAKNWAPGE PNNRQKDEDC VEIYIKREKD VGMWNDERCS KKKLALCYTA ACTNTSCSGH GECVETINNY TCKCDPGFSG LKCEQIVNCT ALESPEHGSL VCSHPLGNFS YNSSCSISCD RGYLPSSMET MQCMSSGEWS APIPACNVVE CDAVTNPANG FVECFQNP GS FPWNTTCTFD CEEGFELMGA QSLQCTSSGN WDNEKPTCKA VTCRAVRQPQ NGSVRCSHSP AGEFTFKSSC NFTCEEFGML QGPAQVECTT QGQWTQQIPV CEAFQCTALS NPERGYMNCL PSASGSFRYG SSCEFSCEQG FVLKGSKR LQ CGPTGEWDNE KPTCEAVRCD AVHQPPKGLV RCAHSPIGEF TYKSSCAFS C EEGFELHGST QLECTSQGQW TEEVPSCQV V KCSSLAVPGK INMSCSGEPV FGTVCKFACP EGWTLNGSAA RTCGATGHWS GLLPTCEAPT ESNIPVLVAGL SAAGLSLLTL APFLLWLRKC LRKAKKFVPA SSCQSLESDG SYQKPSYIL
133	Dominio extracelular de E- selectina humana	WSYNTSTEAM TYDEASAYCQ QRYTHLVAIQ NKEEIEYLNS ILSYSPSYW IGIRKVNNVW VWVGTTQKPLT EEAKNWAPGE PNNRQKDEDC VEIYIKREKD VGMWNDERCS KKKLALCYTA ACTNTSCSGH GECVETINNY TCKCDPGFSG LKCEQIVNCT ALESPEHGSL VCSHPLGNFS

		YNSSCSISCD RGYLPSSMET MQCMSSGEWS APIPACNVVE CDAVTNPANG FVECFQNP GS FPWNTTCTFD CEEGFELMGA QSLQCTSSGN WDNEKPTCKA VTCRAVRQPQ NGSVRCSHSP AGEFTFKSSC NFTCEEGFML QGPAQVECTT QGQWTQQIPV CEAFQCTALS NPERGYMNCL PSASGSFRYG SSCEFSCEQG FVLKGSKR LQ CGPTGEWDNE KPTCEAVRCD AVHQPPKGLV RCAHSPIGEF TYKSSCAFSC EEGFELHGST QLECTSQGW TEEVPSCQV KCSSLAVPGK INMSCSGEPV FGTVCKFACP EGWTLNGSAA RTCGATGHWS GLLPTCEAPT ESNIP
134	E-selectina de ratón (residuos de aminoácidos 22-612 de la secuencia de UniProtKB Q00690)	WYYNASSELM TYDEASAYCQ RDYTHLVAIQ NKEEINY LNS NLKHSPSYW IGIRKVN NVW IWVGTGKPLT EEAQNWAPGE PNNKQRNEDC VEIYIQRTKD SGMWNDERCN KKKLALCYTA SCTNASCSGH GECIETINSY TCKCHPGFLG PNCEQAVTCK PQEHPDYGSL NCSHPFGPFS YNSSCSFGCK RGYLPSSMET TVRCTSSGEW SAPAPACHVV ECEALTHPAH GIRKCSSNPG SYPWNTTCTF DCVEGYRRVG AQNLQCTSSG IWDNETPSCK AVTCD AIPQP QNGFVSCSHS TAGELAFKSS CNFTCEQSFT LQGPAQVECS AQGQWTPQIP VCKAVQCEAL SAPQQGNMKC LPSASGPFQNGSSCEFSCEE GFELKGSRR L QCGPRGEWDS KKPTCSAVKC DDVPRPQNGV MECAHATTGE FTYKSSCAFQ CNEGFSLHGS AQLECTSQGK WTQEVPSQV VQCPSLDVPG KMNMSCSGTA VFGTVCEFTC PDDWTLNGSA VLTCGATGRW SGMPPTCEAP VSPTRPLVVA LSAAGTSLLT SSSLLYLLMR YFRKKAKKFV PASSCQSLQS FENYHVPSYN V
135	Dominio extracelular de E- selectina de ratón	WYYNASSELM TYDEASAYCQ RDYTHLVAIQ NKEEINY LNS NLKHSPSYW IGIRKVN NVW IWVGTGKPLT EEAQNWAPGE PNNKQRNEDC VEIYIQRTKD SGMWNDERCN KKKLALCYTA SCTNASCSGH GECIETINSY TCKCHPGFLG PNCEQAVTCK PQEHPDYGSL NCSHPFGPFS YNSSCSFGCK RGYLPSSMET TVRCTSSGEW SAPAPACHVV ECEALTHPAH GIRKCSSNPG SYPWNTTCTF DCVEGYRRVG AQNLQCTSSG IWDNETPSCK AVTCD AIPQP QNGFVSCSHS TAGELAFKSS CNFTCEQSFT LQGPAQVECS AQGQWTPQIP VCKAVQCEAL SAPQQGNMKC LPSASGPFQNGSSCEFSCEE GFELKGSRR L QCGPRGEWDS KKPTCSAVKC DDVPRPQNGV MECAHATTGE FTYKSSCAFQ CNEGFSLHGS AQLECTSQGK WTQEVPSQV VQCPSLDVPG KMNMSCSGTA VFGTVCEFTC PDDWTLNGSA VLTCGATGRW SGMPPTCEAP VSPTRP
136	1444_H FV_H	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTGGGCTA TGCCATCCGT

		TCTGCCTACA TGCCTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GTGGACTCCG TGACCGGCCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CGGTGTCGTC G
137	1444_L FV_L	GATATTTCAGA TGACGCAGTC CCCATCTTCC CTTTCAGCAT CTGTGGGTGA CCGGGTTACA ATCACTTGTA AAACATCCCA GAACATTGAG CGTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCG GGTAAAGCCC CGAAACTATT GATTTATGCC GCGTCCTCGC TGCAATCCGG CGTGCCGAGT CGTTTTAGCG GCTCCGGGAG CGGCACCGAT TTTACTCTTA CCATTTTCGAG TCTGCAGCCG GAAGACTTTG CCACTTATTT CTGTCTCCAG GATAACGCCT GGCCATTAAC CTTCCGGTCAG GGTACCAAAG TTGAAATTAA A
138	1444_HC (con lisina del terminal C (K))	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTCCGGGCTA TGCCATCCGT TCTGCCTACA TGCCTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GTGGACTCCG TGACCGGCCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CGGTGTCGTC GGCCTCGACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTIONTTC CCCGAACCAG TGACGGTGTC GTGGAACCTCA GGCGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC AACGTGAATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGTTGAGCC CAAATCTTGT GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAG CCGCTGGGGC ACCGTGAGTC TTCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC

		CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA TAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CCCCGGGAAA A
139	1444 LC	GATATTGAGA TGACGCAGTC CCCATCTTCC CTTTCAGCAT CTGTGGGTGA CCGGGTTACA ATCACTTGTA AAACATCCCA GAACATTGAG CGTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCG GGTAAGGCC CGAAACTATT GATTTATGCC GCGTCCTCGC TGCAATCCGG CGTGCCGAGT CGTTTTAGCG GCTCCGGGAG CGGCACCGAT TTTACTCTTA CCATTTTCGAG TCTGCAGCCG GAAGACTTTG CCACTTATTT CTGTCTCCAG GATAACGCCT GGCCATTAAAC CTTCCGGTCAG GGTACCAAAG TTGAAATTAA ACGTACGGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CTTCCCGCCA TCTGATGAGC AGTTGAAATC TGGAAGTGCC TCTGTTGTGT GCCTGCTGAA TAACTTCTAT CCCAGAGAGG CCAAAGTACA GTGGAAGGTG GATAACGCC TCCAATCGGG TAACTCCCAG GAGAGTGTCA CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCCTGACG CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT GCGAAGTCAC CCATCAGGGC CTGAGCTCGC CCGTCACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT GT
140	1444 H secuencia líder	ATGGAATGGA GCTGGGTCTT TCTCTTCTTC CTGTCAGTAA CTACAGGTGT CCACTCC
141	1444 L secuencia líder	ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTGGCAACAG CTACAGGCGT GCACTCC
142	1444_H CH (con lisina del terminal C (K))	GCGTCGACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAAGTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTTGTG ACAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAAGC CGCTGGGGCA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC

		CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGAAAA
143	1444_L CL	CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG T
144	0841_humanized1_H FV_H	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTCGGGCTA TAACATCCGT TCTAGCTACA TGCAGTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GCTGAGAAGT TCAAAATCCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CGGTGTCGTC G
145	0841_humanized1_L FV_L	GATATTCAGA TGACGCAGTC CCCATCTTCC CTTTCAGCAT CTGTGGGTGA CCGGGTTACA ATCACTTGTA AAACATCCCA GAACATTAAC CGTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCG GGTAAAGCCC CGAAACTATT GATTTATAAC GCGAACTCGC TGCAAAGTGG CGTGCCGAGT CGTTTTAGCG GCTCCGGGAG CGGCACCGAT TTTACTCTTA CCATTTTCGAG TCTGCAGCCG GAAGACTTTG CCACTTATTT CTGTCTCCAG GATAACTCCT GGCCATTAAC CTTCCGTCAG GGTACCAGG TTGAAATTAA A
146	0978_humanized2_H	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC

	FV_H	TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTCGGGCTA TAACATCCGT TCTAGCTACA TGCACTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GTGGACTCCG TGAAAGGCCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CGGTGTCGTC G
147	0978_humanized2_L FV_L	GATATTCAGA TGACGCAGTC CCCATCTTCC CTTTCAGCAT CTGTGGGTGA CCGGGTTACA ATCACTTGTA AAACATCCCA GAACATTAAC CGTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCG GGTAAAGCCC CGAAACTATT GATTTATGCC GCGTCCTCGC TGCAATCCGG CGTGCCGAGT CGTTTTAGCG GCTCCGGGAG CGGCACCGAT TTTACTCTTA CCATTTTCGAG TCTGCAGCCG GAAGACTTTG CCACTTATTT CTGTCTCCAG GATAACTCCT GGCCATTAAC CTTCGGTCAG GGTACCAAAG TTGAAATTAA A
148	0164_chimera_H FV_H	GAAGTCCAGC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAG TTTGGGAAAC CTGGGACCTC AGTCAAGTTG TCTTGCAAGG TTTCTGGGTA TAACATTAGG AGTTCATACA TGCACTGGGT GAATCAGAGG CCTGGAAAGG GCCTGGAATG GATAGGAAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GCTGAGAAGT TCAAAATCAA GGCCATTCTG ACTGCAGATT CATCGTCCAA CACAGCCTAC ATGCAACTCA GCCAACTGAA ATCTGACGAC ACAGCAATCT ATTTTTGTGC TATGGACCTC TACAGTACCT CTGAATACTG GGGCCAAGGA GTCATGGTCA CAGTCTCCTC A
149	0164_chimera_L FV_L	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCTTCATTC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA CAGAGTCACT ATCAACTGCA AAACGAGTCA GAATATTAAC AGGTACTTAA ACTGGTACCA GCAAAAGCTT GGAGAAGCTC CCAAACCTCT GATATATAAT GCAAACAGTT TGCAAACGGG CATCCCATCA CGGTTCACTG CCAGTGGATC CGGTACTGAT TTCACACTCA CCATCAACAG CCTGCAGCCT GAAGATGTTG CCACATATTT TTGCTTGACG GATAATAGTT GGCCGCTCAC GTTCGGTTCT GGGACCAAGC TGGAGATCAA A
150	1448_optimized_H FV_H	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTCGGGCTA TGCCATCCGT TCTGCCTACA TGCACTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GTGGACTCCG TGAAAGAGCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC

		CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CCGTGTCGTC G
151	1284_optimized_H_FV_H	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTCGGGCTA TGCCATCCGT TCTGCCTACA TGCACTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GTGGAGTCCG TGGAGGGCCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CCGTGTCGTC G
152	1282_optimized_H_FV_H	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTCGGGCTA TGCCATCCGT TCTGCCTACA TGCACTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GTGGACTCCG TGGAGGGCCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CCGTGTCGTC G
153	0525_humanized_H_FV_H	GAGGTACAGT TGGTGAATC TGGCGGCGGC CTGGTCCAGC CGGGCGGGTC TTTGCGCCTG AGTTGTGCAG CGAGTGGGTT TAGCCTGACG GGCTACTACA TGCAATGGGT CCGTCAGGCG CCGGGCAAAG GTCTGGAATG GATGGGTTTT ATACGGAGTA GTGGAAGCAC AGAGTATAAT TCAGAGTTCA AATCCCGTTT TACCATCTCT CGCGATAACG CGAAAAACAG CGTGTATCTG CAGATGAATA GCCTGCGCGC CGAAGATACC GCCGTGTACT ACTGCGCGCG TTGCCCGTAT AAATATAGTT CATTTGTATA TGTGGGTGTC ATGGATGCGT GGGGCCAGGG TACACTGGTT ACCGTGAGCT CG
154	0525_humanized_L_FV_L	GATATCCAAA TGACGCAATC GCCTAGCAGC TTATCCGCGT CAGTTGGCGA TCGCGTGACC ATCACTTGCA AAGCGTCGCA AACCGTCGGA ATCAACGTGG ATTGGTACCA ACAGAAACCG GGCAAGGCGC CGAAACTGCT GATCTATGGA GCCAGCAATC GCCACACAGG AGTGCCGTCC CGTTTTAGCG GCAGCGGGAG CGGTACGGAT TTTACCCTGA CGATTTCTTC ACTCCAACCC GAAGACTTTG CAACCTATTG CTGCTTGCAA TATGGTTCAA TCCCGCATAC TTTCGGCCAG GGTACAAAAG TGGAATTAA A
155	0039_chimera_H_FV_H	CAGGTGCAGC TGAAGGAGAC AGGACCTGGC

		CTGGTGCAAC CAACACAGAC CCTGTCCATC ACATGTACTG TTTCTGGGTT CTCATTAACC GGCTATTATA TGCAGTGGGT TCGCCAGACT CCAGGAAAGG GGCTAGAATG GATGGGATTT ATACGGAGTA GTGGAAGCAC AGAGTATAAT TCAGAGTTCA AATCCCGACT TAGCATCAGC AGGGACACCT CCAAGAACCA AGTTTTCTTA AAAATGAACA GTCTGAAAAC AGAAGATACA GGCGTGATT ACTGTGCCAG ATGCCCTTAT AAGTATAGCA GCTTTGTCTA CGTAGGGGTT ATGGATGCCT GGGGTCAAGG AGCTCCAGTC ACTGTCTCCT CA
156	0039_chimera_L FV_L	GAAATTGTGA TGACCCAGTC TCCCACATCC ATGTCCACAT CAATAGGAGA GAGGGTCACC CTGAACTGCA AGGCCAGTCA GACTGTGGGT ATTAATGTTG ACTGGTACCA ACAGACACCA GGGCAGCCTC CTAACTACT GATATATGGG GCATCCAACC GACACACTGG GGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATT TGGGAGAGAT TTCCTCTCA CCATCAGCAA CGTGGAGGCT GAAGACCTAG CTGTTTATTG CTGTCTGCAA TATGGCTCCA TTCCTCACAC GTTTGGACCT GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A
157	0265_0254_humanized_H FV_H	GAAGTGCAGT TAGTGGAAG TGGCGGTGGC CTGGTGCAAC CGGGAGGATC CTTACGTTTA AGCTGCGCCG TGTCCGGGTT TAGTATCAGC ACCTATAATG TACACTGGCT GCGTCAAGCC CCGGGCAAAG GGTTAGAATG GATGGGAATG ATGTGGAGTG GTGGAAGCCC AGATTATAAT TCAGCTCTCA AATCCCGATT CACTATTAGT CGCGATACCG CAAAAAATC CGTGTACCTT CAGATGAACT CTCTTCGCGC AGAGGATACG GCGGTTTACT ACTGTGCTCG CTGGGGCGGC GGGTTTGATT ACTGGGGCCA GGAACGCTG GTAACGGTTT CCAGT
158	0265_0254_humanized_L FV_L	GACATTCAAC TGACCCAGAG CCCGTCCAGC TTATCTGCGA GTGTTGGGGA CCGGGTCACG ATTACCTGCC GGGCTAGTCA CAGCATTGGG ACGAACTTGC ATTGGTACCA GCAGAAACCT GGCAAAGCTC CGAACTGCT GATTTATTTT ACATCCCAA GCATCAGCGG TGTCCCCTCC CGATTTTCCG GGTCCGGATC CGGTACCGAT TTTACTTTAA CGATCAGCAG TCTGCAGCCA GAGGATTTTCG CCACCTACTA TTGTCAGCAA ACTCAGTCTT GGCCCCTGAC CTTTGGCCAA GGGACCAAGG TAGAAATCAA G
159	0158_chimera_H FV_H	CAGGTGCAGC TGAAGGAGTC AGGACCTGGC CTGGTGCAAC CCTCAGAGAC CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGGTT CTCAATAAGC ACCTATAACG TACACTGGCT TCGACAGCCT CCAGGAAAAG GTCTGGAGTG GATGGGAATG ATGTGGAGTG GTGGAAGCCC AGATTATAAT TCAGCTCTCA AATCCCGACT GAGCATCAGC

		AGGGACACCT CCAAGAACCA AGTTTTCTTA AAAATGAACA GTCTGCAAAG TGAAGACACA ACCACTTACT ACTGTGCCAG ATGGGGGGGG GGCTTTGATT ACTGGGGCCA AGGAGTCATG GTCACAGTCT CCTCA
160	0158_chimera_L FV_L	GACATCGTGC TGA CTCAAGTC TCCAACCACC CTGTCTGTGA CTCCAGGAGA GACAGTCAGT CTCTCCTGCA GGGCTAGCCA TAGTATTGGC ACAAATCTAC ACTGGTATCA ACAAAAAACA AATGAGTCTC CAAGGCTTCT CATCAAGTTT ACTTCCCAGT CCATCTCTGG GATCCCCTCC AGGTTCAAGT CCAGTGGATC AGGGACAGAT TTTACTCTCA ACATCAACAA TGTGGAGTTT GATGATGTCT CAAGTTATTT TTGTCAACAG ACTCAAAGCT GGCCCCTCAC GTTCGGTTCT GGGACCAAGC TGGAGATCAA A
161	0929_0548_humanized_H FV_H	CAAGTACAAC TGGTGCAGAG TGGGGCCGAA GTGAAAAAAC CCGGCGCTAG CGTGAAAGTC AGCTGTAAAG TGTCCGGTTA TAATATTAGA AGCACCTATA TGCATTGGGT GCGTCAAGCG CCGGGCCAGG GCTTAGAGTG GATGGGTAGG ATTGATCCTG CAAATGGAAA TACTATTTAT GCTGAGAAGT TCAAAAGGAG AGTTACGCTG ACCCGCGACA CGTCCACCTC GACGGCCTAT ATGGAGCTGT CTTCTTTACG CTCAGAGGAC ACTGCAGTTT ACTATTGTGC CATGGAAGTT AGAGTTAGCT TCGAATATTG GGGTCAAGGC ACATTGGTCA CGGTCAGCAG T
162	0929_0548_humanized_L FV_L	GATATCCAGA TGA CTCAATC TCCATCGAGC CTTTCGGCGT CAGTGGGTGA TCGTGTTACC ATCACTTGTA AGGCCTCCCA AAACATTAAT AAATATCTGG ACTGGTACCA GCAGAAACCG GGCAAAGCCC CAAAGTTACT GATCTACTAT ACAAATAACC TACACACAGG TGTTCCATCA CGCTTTTCAG GTAGCGGAAG CGGGACCGAC TTTACGTTTA CGATCTCCAG CTTGCAACCA GAAGACATTG CCACTTATTA TTGTCTCCAG CATGACAGTG GCTATACCTT TGGACAGGGT ACTAAGGTGG AAATCAAG
163	0159_chimera_H FV_H	GAAGTCCAGC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAG CTAGGGAAAC CTGGGACCTC AGTCAAGTTG TCTTGCAAGG TTTCTGGCTA TAACATTAGG AGTACCTACA TGCACTGGGT GAGTCAGAGG CCTGGAAAGG GCCTGGAATG GATAGGAAGG ATTGATCCTG CAAATGGAAA TACTATTTAT GCTGAGAAGT TCAAAAGGAA GGCCACACTG ACTGCAGATA CATCGTCCAA CACAGCCTAC ATGCAACTCA GCCAACTGAA ATCTGACGAC AGAGCAATCT ATTTTGTGC TATGGAAGTA CGGGTGTCTT TTGAGTACTG GGGCCAGGGA GTCATGGTCA CCGTCTCCTC A
164	0159_chimera_L FV_L	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCTTCATTC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA CAGAGTCACT

		ATCAACTGCA AAGCAAGTCA GAATATTAAC AAGTACTTAG ACTGGTATCA GCAAAAGCTT GGTGAAGGTC CCAAACCTCT GATATATTAT ACAAACAATT TACATACAGG AATCCCATCA AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGTACTGAT TTCACACTTA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATGTTG CCACATATTT CTGCCTTCAG CATGACAGTG GGTACACGTT TGGAGCTGGG ACCAAGCTGG AACTGAAA
165	0955_0300_humanized_H FV_H	CAAGTGCAGC TGGTACAGTC TGGTGCCGAG GTTAAAAAGC CGGGTAGTAG CGTGAAAGTA AGCTGCAAAG TGAGTGGTTA TAGCATTTCGT TCAACCTATA TGCACCTGGT TCGTCAGGCG CCAGGCCAAG GTCTCGAGTG GATGGGAAGG ATTGATCCTG CAAATGGAAA TACAATATAT GCTGAGAGGT TCAAAAACCG CGTGACGCTG ACCGCAGATA CCAGCACTTC CACGGCGTAC ATGGAAGTGT CCTCCCTGCG GTCCGAAGAT ACCGCAGTAT ATTATTGCGC CGTAGAAATC CTAGGCATTT TTGATTATTG GGGGCAGGGC ACACTGGTCA CCGTATCGAG C
166	0955_0300_humanized_L FV_L	GATATACAAA TGACACAGAG TCCGAGTTCC CTATCAGCGA GCGTGGGAGA CAGGGTTACC ATAACGTGTA AAGCATCGCA GAATATTGAC AAATATCTCG ACTGGTATCA ACAGAAGCCG GGCAAAGCAC CAAACCTCCT TATGTATAAC ACCAACTCTT TACATACTGG CGTCCCAAGT CGTTTTTCGG GGTCTGGCAG CGGCACAGAT TTTACGCTCA CCATTAGTTC GCTGCAGCCA GAAGACTTTG CTACCTACTT CTGTCTGCAA CATAATAGCG GCTACACCTT CGGTCAGGGG ACTAAAGTTG AAATAAAA
167	0170_chimera_H FV_H	GAAGTCCAGC TGCAGCAGTC CGGGGCTGAG CTTGGGAAAC CTGGGACCTC AGTCAAGTTG TCTTGCAAGG TTTCTGGCTA TAGTATTAGG AGTACCTACA TGCACCTGGT GAATCAGAGG CCTGGAAAGG GCCTGGAATG GGTAGGAAGG ATTGATCCTG CAAATGGAAA TACAATATAT GCTGAGAGGT TCAAAAACAA GGCCACACTG ACTGCAGATA CATCGTCCAA CACAGCCTAC ATGCAACTCA GCCAACTGAA ATCTGACGAC ACAGCAATCT ATTTTGTGTC TGTGGAGATC CTTGGGATCT TTGATTACTG GGGCCAAGGA GTCATGGTCA CAGTCTCCTC A
168	0170_chimera_L FV_L	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCTTCATTC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA CAGAGTCACT ATCAACTGCA AAGCAAGTCA GAATATTGAC AAGTACTTAG ACTGGTATCA GCAAAAGCTT GGTGAAGCTC CCAAACCTCT GATGTATAAT ACAAACAGTT TGCATACAGG AATTCCATCA AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGTACTGAT TTCACACTTA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATGTTG CCACATATTT CTGCCTTCAG

		CATAACAGTG GGTACACGTT TGGAGCTGGG ACCAAGCTGG AACTGAAA
169	0564 humanized H FV H	GAGGTACAGC TGGTTGAATC GGGTGGTGGT CTGGTTCAGC CGGGTGGCTC ATTAAGACTG TCATGCGCCG TGTCTGGTTA TAAAATCCGC AGCAGTTATA TGCATTGGGT TCGTCAAGCT CCGGGTAAAG GTTTAGAATG GATCGGGAGG ATTGATCCTG CAAATGGAAA TACTATATAC GGTGACAAGT TCAAAAGTCG GTTTACTCTG TCATCCGATA CCGCGAAAAA CTCAGCCTAT CTGCAAATGA ATTCCCTGCG CGCGGAAGAC ACTGCTGTCT ATTATTGCGC AATTGATATC GGTACCACGT TTGATTATTG GGGCCAGGGT ACGTTGGTGA CGGTTAGCTC C
170	0564 humanized L FV L	GACATCCAAA TGACCCAATC TCCGAGTTCT CTGTCTGCTT CCGTGGGCGA CCGAGTCACC ATAACCTGTA AGGCTTCGCA ACACATCAAC CGTTATTTGA ACTGGTATCA ACAGAAACCG GGGAAAGCGC CGAAATTGCT GATTTATGAT GCTAACAACC TGCAGACAGG CGTACCATCG CGATTTAGCG GCTCCGGAAG CGGGACGGAT TTTACTCTCA CCATCAGCTC TCTGCAGCCG GAAGACTTTG CAACCTATTT CTGTTTACAG CATAATTCCT GGCCGAATAC CTTTGGCCAG GGGACAAAGG TGGAATCAA A
171	0180 chimera H FV H	GAGGTCCAGC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAG CTTGGGAAAC CTGGGACCTC AGTCAAGTTG TCTTGCAAGG TTTCTGGCTA TAAGATTAGG AGTTCCTACA TGCAGTGGGT GAATCAGAGG CCTGGAAAGG GCCTGGAATG GATAGGAAGG ATTGATCCTG CAAATGGAAA TACTATATAC GGTGACAAGT TCAAAAGTAA GGCCACACTG ACTTCAGATA CATCGTCCAA CACAGCCTAC ATCCAACCTCA GCCAACTGAA ATCTGACGAC ACAGCAATCT ATTTTTGTGC TATAGATATA GGTACAACCT TTGATTATTG GGGCCAAGGA GTCATGGTCA CAGTCTCCTC A
172	0180 chimera L FV L	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCTTCATTC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA CAGAGTCACT ATCAACTGCA AAGCAAGTCA GCATATTAAT AGGTACTTAA ACTGGTACCA GCAAAAGCTT GGAGAAGCTC CCAAACCTCCT GATATATGAT GCAAAACAATT TGCAAACGGG CATCCCATCA CGGTTCAAGT GCAGTGGATC TGGTACTGAT TTCACACTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATGTTG CCACATATTT CTGCTTGACG CATAATAGTT GGCCGAACAC GTTTGGGGCT GGGACCAAGC TGGAATTGAA A
173	0027 chimera H FV H	GAAGTCCACC TGCACCAGTC TGGGCCTGAG CTTGGGAGGC CTGGGTCCTC AGTCAAGATT TCTTGCAAGG CTTCTGGCTA CACCTTTACA GATTACGTTA TGAAGTGGGT GAGGCAGAGT CCTGGACAGG GGCTGGAATG GATAGGATGG

		ATCAATCCTG AAGATTATAG TTTTGATTCT GGTGAGAAGT TCCTAGAGAG GGCCACACTG ACTGCAGCTA CGTCCTCCAA CACAGTCTAC ATCCAGCTTA GCGGCCTGAC ATCTGACGAC ACAGCCACCT ATTTTGTGT TAGAGGGGGA CTACCCGGGG ATTGGTTTGC TTAGTGGGGC CAAGGCACTC TGGTCACTGT CTCTTCA
174	0027_chimera_L FV_L	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCTTCATTC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA CAGAATCACT ATCAACTGCA AGACAAGTCA GAATATTAAC AGGTACTTAA ACTGGTTCCA GCAAAGCTT GGAGAACCTC CCAAACCTCT GATATATAAT GCAAACAGTT TGCAAGCGGA CATTCCATCA CGGTTCACTG GCAGTGGATC TGGTACTGAT TTCACACTCA CCATCACCAG CCTGCAGCCT GAAGATGTTG CCACATATTT CTGCTTGACG CATCATTTCT GGCCGTACAC GTTTGGAGCT GGGACCAAGC TGGAAGTGA A
175	E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> truncada (residuos de aminoácidos 22-556 de la secuencia de UniProtKB G8F370)	WSYNTSTEAMTYDEASAYCQQRythlVAIQNK EEIEYLNSILSYSPSYWIGIRKVN NVWVVG TQKPLTEEAKNWAPGEPNNRQKDEDCVEIYIK RDKDVG MWNDERCSKKLALCYTA ACTNTSCS GHGECVETINNYTCKCDPGFSGLECEQIVNCT ALESPEHGSLVCSHPLGNFSYSSSCSVSCDRG YLPSSVETTQCMSSGEWSVPIPACKVVECDV TNPANGFVECFQNP GSFPWNTTCTFDCEE GFE LMGAQSLQCTSSGNWDNEKPTCKAVTCRAIRQ PQNGSVRCSHSPAGEFTFKSSCNFTCEE GFML QGAAQVECTTQGWTTQVPVCEAFQCTALSNP ERGYMNCLPSASGSFRNGSSCEFSCEQG FVLK GSKRLQCGPTGEWDNEKPTCEAVRCDVHQ PQ RGLVRCAHSPIGEFTYKSSCAFSCEE GFELHG STQLECTSQGWTEEVPSQVVKCSSLAVLEK INMSCSGEPVFGTV CNFACPEGWRLNGSAAMT CGATGHWSGMLPTCEAPTESNTP
176	sitio de desamidación de NG (subrayado) en CDR2 de HC	IDPANGNTIYAEK
177	sitio de desamidación de NR (subrayado) en CDR1 de LC	TSQNINRYLNWYQQKPGK
178	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto H27	YNIRSSYM
179	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto H63	FKIRFTISA
180	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto H65	IRFTISADN
181	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto L29	INRYLNWYQ

182	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto L46	LLIYNANSL
183	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto L47	LIYNANSLQ
184	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto L48	IYNANSLQT
185	Epítipo de linfocitos T que no son de línea germinal previsto L49	YNANSLQTG
186	Secuencia DP-54 de H59-H65	YVDSVKG
187	Epítipo de linfocitos T previsto H63	VKGRFTISA
188	Epítipo de linfocitos T previsto H27	YAIRSAYMH
189	Epítipo de linfocitos T previsto H63	VEGRFTISA
190	Epítipo de linfocitos T previsto H63	VTGRFTISA
191	Epítipo de linfocitos T previsto H63	VKERFTISA
192	Epítipo de linfocitos T previsto L29	IERYLNWYQ
193	péptido tríptico para E-selectina	CSSLAVLEK
194	región CDR2 de HC de 1444	IDPANGNTIYVDSVTGR
195	región CDR1 de LC de 1444	TSQNIERYLNWYQQKPGK
196	E-selectina humana UniProtKB P16581 (la secuencia líder está subrayada)	MIASQFLSALTVLVLLIKESGAWSYNTSTEAMT YDEASAYCQQRythLVAIQNKEEIEYLNSILS YSPSYWIGIRKVN NVWVVG TQKPLTEEAKN WAPGEPNNRQKDEDCVEIYIKREKDVGMWNDE RCSKKLALCYTAACNTNTSCSGHGECVETINN YTCKCDPGFSGLKCEQIVNCTALESPEHGSLV CSHPLGNFSYNSSCSISCDRGYLPSSMETMQC MSSGEWSAPI PACNVVECDAVTNPANGFVECF QNPGSF PWNTTCTFDCEEGFELMGAQSLQCTS SGNWDNEKPTCKAVTCRAVRQPQNGSVRCSHS PAGEFTFKSSCNFTCEEGFMLQGPAQVECTTQ GQWTQQIPVCEAFQCTALSNPERGYMNCLPSA SGSFRYGSSCEFSCEQG FVLK GSKRLQCGPTG EWDNEKPTCEAVRCDAVHQPPKGLVRCAHSPI GEFTYKSSCAFSCEEGFELHGSTQLECTSQGQ WTEEV PSCQVVKCSSLAVPGKINMSCSGEPVF GTVCKFACPEGWTLNGSAARTCGATGHWSGLL PTCEAPTESNIPLVAGLSAAGLSLLTLAPFL WLRKCLRKAKKFVPASSCQSLES DGSYQKPSY IL

197	E-selectina humana truncada (residuos de aminoácidos 22-178 de la secuencia de UniProtKB P16581)	WSYNTSTEAMTYDEASAYCQQRythlVAIQNK EEIEYLNSILSYSPSYWIGIRKVNNVWVWG TQKPLTEEAKNWAPGEPNNRQKDEDCVEIYIK REKDVGMWNDERCSKKKLALCYTAACTNTSCS GHGECVETINNYTCKCDPGFSGLKCEQIV
198	E-selectina de ratón UniProtKB Q00690 (la secuencia líder está subrayada)	<u>MNASRFLSALVFVLLAGESTAWYYNASSELMT</u> YDEASAYCQRDYTHLVAIQNKKEEINYLNLSNLK HSPSYWIGIRKVNNVWVWG TGKPLTEEAQN WAPGEPNNKQRNEDCVEIYIQRTKDSGMWNDE RCNKKKLALCYTASCTNASCSGHGECIETINS YTCKCHPGFLGPNCEQAVTCKPQEHDPYGS LN CSHPFGPFSYNSSCSFGCKRGYLPSSMETTVR CTSSGEWSAPAPACHVVECEALTHPAHGIRKC SSNPGSYPWNTTCTFDCVEGYRRVGAQNLQCT SSGIWDNETPSCKAVTCDAI PQPQNGFVSCSH STAGELAFKSSCNFTCEQSFTLQGPQVECSA QGQWTPQIPVCKAVQCEALSAPQQGNMKCLPS ASGPFQNGSSCEFSCEEGFELKGSRRLLQCGPR GEWDSKKPTCSAVKCDVPRPQNGVMECAHAT TGEFTYKSSCAFCNEGFS LHGSAQLECTSQG KWTQEV PSCQV VQCPSLDVPGKMNMSCSGTAV FGTVCEFTCPDDWTLNGSAVLTCGATGRWSGM PPTCEAPVSPTRPLVVALSAAGTSLLTSSSL YLLMRYFRKKAKKFVPASSCQSLQSFENYHVP SYNV
199	E-selectina de ratón truncada (residuos de aminoácidos 22-178 de la secuencia de UniProtKB Q00690)	WYYNASSELMTYDEASAYCQRDYTHLVAIQNK EEINYLNLSNLKHSPSYWIGIRKVNNVWVWG TGKPLTEEAQNWAPGEPNNKQRNEDCVEIYIQ RTKDSGMWNDERCNKKKLALCYTASCTNASCS GHGECIETINSYTCKCHPGFLGPNCEQAV
200	E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> UniProtKB G8F370 (la secuencia líder está subrayada)	<u>MIASQFLSAL TLVLLIKESG AWSYNTSTEA</u> MTYDEASAYC QQRythlVAI QNKKEEIEYLN SILSYSPSYWIGIRKVN NVWVGTQKPL TEEAKNWAPG EPNNRQKDED CVEIYIKRDK DVGMWNDERC SKKKLALCYT AACTNTSCSG HGECVETINN YTCKCDPGFS GLECEQIVNC TALESPEHGS LVCSHPLGNF SYSSSCSVSC DRGYLPSSVE TTQCMSSGEW SVPIPACKVV ECDAVTNPAN GFVECFQNP G SFPWNTTCTF DCEEGFELMG AQSLQCTSSG NWDNEKPTCK AVTCRAIRQP QNGSVRCSHS PAGEFTFKSS CNFTCEEGFM LQGAAQVECT TQGQWTQQVP VCEAFQCTAL SNPERGYMNC LPSASGSFRN GSSCEFSCEQ GFVLKGSKRL QCGPTGEWDN EKPTCEAVRC DAVHQ PQRL VRC AHSPIGE FTYKSSCAFS CEEGFELHGS TQLECTSQGQ WTEEV PSCQV VKCSSLAVLE KINMSCSGEP VFGTV CNFAC PEGWRLNGSA AMTCGATGHW SGMLPTCEAP TESNTPLVAG LSAAGLSLLT LAPFLWLRLK CFRKAKKFVP ASSCQSLES D GSYQKPSYIL
201	E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> (residuos de	WSYNTSTEAMTYDEASAYCQQRythlVAIQNK EEIEYLNSILSYSPSYWIGIRKVN NVWVWG

	aminoácidos 22-610 de la secuencia de UniProtKB G8F370)	TQKPLTEEAKNWAPGEPNNRQKDEDCVEIYIK RDKDVGMMWNDERCSKKKLALCYTAACNTNTSCS GHGECVETINNYTCKCDPGFSGLECEQIVNCT ALESPEHGSLVCSHPLGNFSYSSSCSVSCDRG YLPSSVETTQCMSSGEWSVPIPACKVVECDV TNPANGFVECFQNPFSFPWNTTCTFDCEEGFE LMGAQSLQCTSSGNWDNEKPTCKAVTCRAIRQ PQNGSVRCSHSPAGEFTFKSSCNFTCEEFGML QGAAQVECTTQGGWTQQVPVCEAFQCTALSNP ERGYMNCLPSASGSFRNGSSCEFSCEQGFLVK GSKRLQCGPTGEWDNEKPTCEAVRCDVHQPQ RGLVRCAHSPIGEFTYKSSCAFSCEEGFELHG STQLECTSQGQWTEEVPSQVVKCSSLAVLEK INMSCSGEPVFGTVCNFACPEGWRLNGSAAMT CGATGHWSGMLPTCEAPTESNTPLVAGLSAAG LSLLTLAPFLLWLRKCFRKAkkFVPASSCQSL ESDGSYQKPSYIL
202	IGHV3-07*01 (DP-54) línea germinal de la cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY WMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
203	IGHJ4*01	YFDYWGQGTTLVTVSS
204	IGKV1-39*01 (DPK-9) línea germinal de la cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP
205	IGKJ1*01	WTFGQGTKEIK
206	secuencia de ácidos nucleicos de HC de 1444 (sin lisina del terminal C (K))	GAAGTGCAGC TTGTGGAATC CGGGGGCGGC TTGGTCCAAC CGGGTGGCAG CCTCCGTCTG TCGTGCGCGG CTTCGGGCTA TGCCATCCGT TCTGCCTACA TGCACTGGGT TCGCCAGGCG CCTGGGAAGG GCCTGGAATG GGTGGCCAGG ATTGATCCTG CAAACGGAAA TACTATATAT GTGGACTCCG TGACCGGCCG CTTTACAATC AGCGCCGACA ACGCTAAGAA TTCCGCCTAC CTGCAAATGA ATAGCCTGCG GGCAGAGGAT ACCGCGGTGT ACTATTGTGC CATGGATTTA TATTCCACGT CTGAATATTG GGGCCAAGGA ACCCTGGTAA CGGTGTCGTC GCGTCGACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTIONTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAACCTCA GGCGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC AACGTGAATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGTTGAGCC CAAATCTTGT GACAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAG CCGCTGGGGC ACCGTGAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC

		CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC
		GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG
		CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC
		CGTGTGGTCA	GCGTCCTCAC	CGTCCTGCAC
		CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG
		TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC
		CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA
		GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGTACACC
		CTGCCCCCAT	CCCGGGAGGA	GATGACCAAG
		AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA
		GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAG
		TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	GGAGAACAAC
		TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	GCTGGACTCC
		GACGGCTCCT	TCTTCCTCTA	TAGCAAGCTC
		ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG
		AACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGCATGAG
		GCTCTGCACA	ACCACTACAC	GCAGAAGAGC
		CTCTCCCTGT	CCCCGGGA	

[00151] **Tabla 3.** Anticuerpos anti-E-selectina.

Anticuerpo	HCDR-1	HCDR-2	HCDR-3	LCDR-1	LCDR-2	LCDR-3	VH	VL	JH (FW_H4)	JK (FW_L4)	CL	CH	HC	LC	L líder	H líder	FV_H ADN	FV_L ADN
1444 optimizado	8	9	10	2	3	4	11	5	12	6	14	15/16	7/13	1	129	130	136	137
0841 humanizado	23	24	10	18	19	20	25	21	12	6	14	16	22	17	129	129	144	145
0978 humanizado	23	29	10	18	3	20	30	27	12	6	14	16	28	26	129	129	146	147
0164 quimérico	23	24	10	18	19	20	35	32	36	33	14	15	34	31	131	131	148	149
1448 optimizado	8	38	10	2	3	4	39	5	12	6	14	16	37	1	129	129	150	137
1284 optimizado	8	41	10	2	3	4	42	5	12	6	14	16	40	1	129	129	151	137
1282 optimizado	8	44	10	2	3	4	45	5	12	6	14	16	43	1	129	129	152	137
0525 humanizado	52	53	54	47	48	49	55	50	12	6	14	16	51	46	129	129	153	154
0039 quimérico	52	53	54	47	48	49	60	57	61	58	14	15	59	56	131	131	155	156
0265_0254 humanizado	63	64	65	68	69	70	66	71	12	6	14	16	62	67	129	129	157	158
0158 quimérico	63	64	65	68	69	70	75	73	36	33	14	15	74	72	131	131	159	160
0929_0548 humanizado	77	78	79	82	83	84	80	85	12	6	14	16	76	81	129	129	161	162
0159 quimérico	77	78	79	82	83	84	90	87	36	88	14	15	89	86	131	131	163	164
0955_0300 humanizado	92	93	94	97	98	99	95	100	12	6	14	16	91	96	129	129	165	166
0170 quimérico	92	93	94	97	98	99	104	102	36	88	14	15	103	101	131	131	167	168
0564 humanizado	111	112	113	106	107	108	114	109	12	6	14	16	110	105	129	129	169	170
0180 quimérico	111	112	113	106	107	108	118	116	36	88	14	15	117	115	131	131	171	172

Anticuerpo	HCDR-1	HCDR-2	HCDR-3	LCDR-1	LCDR-2	LCDR-3	VH	VL	JH (FW_H4)	JK (FW_L4)	CL	CH	HC	LC	L líder	H líder	FV_H ADN	FV_L ADN
0027 quimérico	125	126	127	18	120	121	128	122	12	123	14	15	124	119	131	131	173	174

[00152] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VH que comprende, o consiste en, un aminoácido de SEQ ID NO: 11.

[00153] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128.

[00154] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

[00155] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122.

[00156] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Un anticuerpo anti-E-

selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 39, 42 o 45. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un

dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128.

[00157] Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122 y un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128.

[00158] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una LCDR-1, una LCDR-2 y una LCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122.

[00159] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende además una HCDR-1, una HCDR-2 y una HCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128.

[00160] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una LCDR-1, una LCDR-2 y una LCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una HCDR-1, una HCDR-2 y una HCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

[00161] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una LCDR-1 que comprende un aminoácido de SEQ ID NO: 2, una LCDR-2 que comprende una secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una LCDR-3 que comprende un aminoácido de SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una HCDR-1 que comprende un aminoácido de SEQ ID NO: 8, una HCDR-2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una HCDR-3 que comprende un aminoácido de SEQ ID NO: 10. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una HCDR-1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una HCDR-2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 38, 41 o 44 y una HCDR-3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

[00162] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una LCDR-1 que comprende un aminoácido de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 18, 47, 68, 82, 97 o 106, una LCDR-2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 3, 19, 48, 69, 83, 98, 107 o 120 y una LCDR-3 que comprende un aminoácido de SEQ ID NO: 4, 20, 49, 70, 84, 99, 108 o 121. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una HCDR-1 que comprende un aminoácido de SEQ ID NO: 8, 23, 52, 63, 77, 92, 111 o 125, una HCDR-2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 24, 29, 38, 41, 44, 53, 64, 78, 93, 112 o 126 y una HCDR-3 que comprende un aminoácido de SEQ ID NO: 10, 54, 65, 79, 94, 113 o 127.

[00163] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una LCDR-1, una LCDR-2 y una LCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126530.

[00164] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una HCDR-1, una HCDR-2 y una HCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126529.

[00165] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una secuencia de aminoácidos de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126530, y una secuencia de aminoácidos de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126529.

[00166] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126530.

[00167] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126529.

[00168] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126530.

[00169] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC con el número de acceso PTA-126529.

[00170] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender una LC que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[00171] Una LC puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 17, 26, 31, 46, 56, 67, 72, 81, 86, 96, 101, 105, 115 o 119. En algunas formas de realización, una LC de anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 17, 26, 31, 46, 56, 67, 72, 81, 86, 96, 101, 105, 115 o 119.

[00172] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender una HC que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender una HC que comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13.

[00173] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 7, 13, 22, 28, 34, 37, 40, 43, 51, 59, 62, 74, 76, 89, 91, 103, 110, 117 o 124. En algunas formas de realización, una HC de anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende, o consiste en, cualquiera de SEQ ID NO: 7, 13, 22, 28, 34, 37, 40, 43, 51, 59, 62, 74, 76, 89, 91, 103, 110, 117 o 124.

[00174] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una LC que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una HC que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, carece de función efectora (es decir, es nula del efector).

[00175] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender una cadena pesada que comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128 (por ejemplo, SEQ ID NO: 11), y que comprende además un dominio constante de IgG1 (por ejemplo, un dominio constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16).

[00176] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una cadena pesada que comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y comprende además un dominio constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende un dominio VH que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y comprende además un dominio constante de IgG1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina carece de funciones efectoras.

[00177] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una región constante de la cadena liviana elegida de, por ejemplo, una región constante de la cadena liviana kappa (por

ejemplo, humana) (por ejemplo, codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14) o una región constante de la cadena liviana lambda.

[00178] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una cadena liviana que comprende un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122 (por ejemplo, SEQ ID NO: 5) y comprende además un dominio constante kappa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende una cadena liviana que comprende un dominio VL que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y comprende además un dominio constante kappa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

[00179] En algunas formas de realización, la región constante de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede alterarse, por ejemplo, mutarse, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir una o más de: la fijación al receptor Fc, la glicosilación del anticuerpo, la cantidad de residuos de cisteína, la función de las células efectoras y/o la función del complemento).

[00180] En algunos aspectos, una variante de anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno, comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones conservadoras o no conservadoras, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 adiciones y/o eliminaciones en la cadena pesada de longitud completa (por ejemplo, una HC de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13) y/o la cadena liviana de longitud completa. En otro aspecto, una variante de anticuerpo comparte al menos 65 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la cadena pesada de longitud completa, y en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno se fija específicamente a E-selectina. En otro aspecto, una variante de anticuerpo comparte al menos 65 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la cadena liviana de longitud completa (por ejemplo, una LC de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1), y en donde dicho anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno se fija específicamente a E-selectina.

Sustituciones de la línea germinal

[00181] Está disponible una amplia variedad de secuencias de la línea germinal humana aceptora, y el proceso para "humanizar" un anticuerpo de especie no humana para su uso en seres humanos es conocido en el estado de la técnica y se lo analiza también en otra parte en la presente. Por lo tanto, la persona del oficio de nivel medio apreciaría que las secuencias de CDR anteriores de un ratón, rata, etc., pueden ubicarse en el contexto de secuencias de aminoácidos de dominio variable humano. Al hacerlo, se realizan por lo general cambios en las secuencias de la línea germinal humana aceptora para preservar la fijación del anticuerpo y otras características deseables del anticuerpo parental original (es decir, donante). Tanto las CDR como las regiones marco (FW) pueden diseñarse por ingeniería genética de la siguiente manera.

[00182] En ciertas formas de realización, una sustitución es una sustitución de la línea germinal humana en la que un residuo de CDR (donante) se reemplaza con el residuo (aceptor) de la línea germinal humana correspondiente, para aumentar el contenido de aminoácidos humanos y reducir potencialmente la inmunogenicidad del anticuerpo, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 2017/0073395 y Townsend *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2015; 112(50):15354-15359, ambos incorporados en la presente por referencia en su totalidad.

[00183] Un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un marco VH que comprende una secuencia de marco VH de línea germinal humana. En algunos aspectos, se puede usar un marco VH de las siguientes líneas germinales: IGHV1-2*02, IGHV1-3*01, IGHV1-46*01, IGHV1-69*01, IGHV1-69*02, IGHV1-8*01, IGHV3-7*01, IGHV3-13*01, IGHV3-23*01, IGHV3-23*04, IGHV3-30*01, IGHV3-30*18, IGHV5-10-1*01, IGHV5-10-1*04 o IGHV5-51*01 (los nombres de las líneas germinales se basan en la definición de línea germinal de IMGT). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, utiliza el marco VH de la línea germinal IGHV3-7*01 (SEQ ID NO: 202). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, utiliza el marco VH de la línea germinal IGHV3-7*01 (SEQ ID NO: 202) para las regiones CDR e IGHJ4*01 (SEQ ID NO: 203) para la región marco.

[00184] Los marcos de cadena liviana de línea germinal humana preferidos son marcos derivados de las líneas germinales VK o Vλ. En algunos aspectos, se puede usar un marco VL de las siguientes líneas germinales: IGKV1-12*01, IGKV1-13*02,

IGKV1-33*01, IGKV1-39*01, IGKV1-5*01, IGKV3-11*01, IGKV3-15*01, IGKV3-20*01, IGKV3D-20*02 e IGKV4-1*01 (los nombres de las líneas germinales se basan en la definición de línea germinal de IMGT). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, utiliza el marco VL de la línea germinal IGHV1-39*01 (SEQ ID NO: 204). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, utiliza el marco VL de la línea germinal IGHV1-39*01 (SEQ ID NO: 204) para las regiones CDR e IGKJ1*01 (SEQ ID NO: 205) para la región marco.

[00185] De manera alternativa o adicional, la secuencia de marco puede ser una secuencia de marco de consenso de línea germinal humana, tal como el marco de secuencia de consenso V λ 1, secuencia de consenso VK1, secuencia de consenso VK2, secuencia de consenso VK3, secuencia de consenso de línea germinal VH3, secuencia de consenso de línea germinal VH1, secuencia de consenso de línea germinal VH5, o secuencia de consenso de línea germinal VH4 humanas. Las secuencias de marcos de línea germinal humana están disponibles en distintas bases de datos públicas, tales como V-base, IMGT, NCBI o Abysis.

[00186] Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un marco VL que comprende una secuencia de marco VL de línea germinal humana. Un marco VL puede comprender una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos, sin dejar de conservar una similitud funcional y estructural con la línea germinal de la que derivó. En algunos aspectos, un marco VL es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntico a una secuencia de marco VL de línea germinal humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, comprende un marco VL que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de marco VL de línea germinal humana. En algunas formas de realización, las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos están solo en las regiones marco. En algunas formas de realización, el porcentaje de identidad se basa en la similitud con el dominio VL, sin incluir las porciones definidas en la presente como CDR.

[00187] Por ejemplo, un marco VL de línea germinal humana puede ser el marco de IGKV1-39*01. Por ejemplo, un marco VL de línea germinal humana puede ser el marco de IGKV1-33*01. Un marco VL de línea germinal humana puede ser el

marco de cualquiera de las secuencias de consenso humanas que incluyen: V λ , V λ 1, V λ 3, VK, VK1, VK2 o VK3.

[00188] En algunas formas de realización, un marco VL es IGK-39*01_IGKJ1*01. También se prevé que otras regiones marco similares proporcionarán los anticuerpos ventajosos de la invención que comprenden CDR de SEQ ID NO: 2-4, 18-20, 47-49, 68-70, 82-84, 97-99, 106-108, 120 y 121; y CDR especificadas por las siguientes secuencias de aminoácidos de VL: SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116, 122, que pueden comprender 99 %, 97 %, 96 %, 80 %, 76 %, 74 % y 66 % de identidad, respectivamente, con la región marco de cualquiera de IGKV1-12*01, IGKV1-13*02, IGKV1-33*01, IGKV1-39*01, IGKV1-5*01, IGKV3-11*01, IGKV3-15*01, IGKV3-20*01, IGKV3D-20*02 e IGKV4-1*01. En algunas formas de realización, el porcentaje de identidad se basa en la similitud con VL, sin incluir las porciones definidas en la presente como CDR.

[00189] Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender un marco VH que comprende una secuencia de marco VH de línea germinal humana. Un marco VH puede comprender una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos, sin dejar de conservar una similitud funcional y estructural con la línea germinal de la que derivó. En algunos aspectos, un marco VH es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntico a una secuencia de marco VH de línea germinal humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, comprende un marco VH que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de marco VH de línea germinal humana. En algunas formas de realización, las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos están solo en las regiones marco. En algunas formas de realización, el porcentaje de identidad se basa en la similitud con el dominio VH, sin incluir las porciones definidas en la presente como CDR.

[00190] Por ejemplo, un marco VH de línea germinal humana puede ser el marco de IGHV3-7*01. Por ejemplo, un marco VH de línea germinal humana puede ser el marco de IGHV1-46*01. Por ejemplo, un marco VH de línea germinal humana puede ser IGHV1-69*01. Un marco VH de línea germinal humana puede ser el marco de secuencia de consenso de línea germinal de VH humana. El marco VH de línea germinal humana puede ser el marco de una secuencia de consenso de línea germinal

humana que incluye: VH3, VH5, VH1 o VH4.

[00191] En algunas formas de realización, un marco VH es IGHV3-7*01. También se prevé que otras regiones marco similares proporcionarán los anticuerpos ventajosos de la invención que comprenden CDR de SEQ ID NO: 8-10, 23, 24, 29, 38, 41, 44, 52-54, 63-65, 77-79, 92-94, 111-113, 125-127 y CDR especificadas por cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos de VH: SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118, 128, incluso IGHV1-2*02, IGHV1-3*01, IGHV1-46*01, IGHV1-69*01, IGHV1-69*02, IGHV1-8*01, IGHV3-7*01, IGHV3-13*01, IGHV3-23*01, IGHV3-23*04, IGHV3-30*01, IGHV3-30*18, IGHV5-10-1*01, IGHV5-10-1*04 o IGHV5-51*01, que pueden comprender 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de identidad, respectivamente, con la región FW de DP-54 y diferencias de un aminoácido o menos en las características estructurales comunes (numeración Kabat). En algunos aspectos, el porcentaje de identidad se basa en la similitud con el dominio VH, sin incluir las porciones definidas en la presente como CDR.

[00192] En ciertas formas de realización, el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, descrito en la presente comprende (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y/o (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 66 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 76 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. La invención también abarca cualquier combinación de estas secuencias de VL y VH.

[00193] En ciertas formas de realización, el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, descrito en la presente comprende (i) una HC que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13, y/o (ii) una LC que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al

menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La invención también abarca cualquier combinación de estas secuencias de HC y LC.

[00194] En ciertas formas de realización, el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, descrito en la presente comprende un dominio Fc. El dominio Fc puede derivar de IgA (por ejemplo, IgA₁ o IgA₂), IgG, IgE o IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina es un anticuerpo IgG1.

Actividad biológica de los anticuerpos anti-E-selectina

[00195] Además de fijar un epítipo en la E-selectina, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de la divulgación puede mediar una actividad biológica. Es decir, la divulgación incluye un anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a la E-selectina y media al menos una actividad detectable seleccionada de las siguientes:

- (i) se fija específicamente a la E-selectina humana;
- (ii) se fija específicamente a la E-selectina de *Macaca fascicularis*;
- (iii) reduce, inhibe y/o neutraliza la interacción (por ejemplo, fijación) entre la E-selectina (por ejemplo, humana, de *Macaca fascicularis*) soluble y un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligandos sialil-Lewis A y/o sialil-Lewis X);
- (iv) reduce, inhibe y/o neutraliza la interacción (por ejemplo, fijación) entre la E-selectina (por ejemplo, humana, de *Macaca fascicularis*) expresada en la superficie celular y un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligandos sialil-Lewis A y/o sialil-Lewis X);
- (v) reduce, inhibe y/o neutraliza la interacción (por ejemplo, adhesión) entre la E-selectina (por ejemplo, humana, de *Macaca fascicularis*) expresada en la superficie celular y ligandos de E-selectina expresados en la superficie celular (por ejemplo, ligandos sialil-Lewis A y/o sialil-Lewis X en, por ejemplo, células HL-60);
- (vi) reduce, inhibe y/o neutraliza la interacción (por ejemplo, adhesión) de la E-selectina soluble con células que expresan ligando de E-selectina (por ejemplo, HL-60);
- (vii) reduce, inhibe y/o neutraliza la adhesión de células que expresan

- ligando de E-selectina (por ejemplo, HL-60) a células que expresan E-selectina en condiciones de flujo estático y fisiológico;
- (viii) reduce, inhibe y/o neutraliza la adhesión de neutrófilos humanos activados a células que expresan E-selectina (por ejemplo, humana y de *Macaca fascicularis*) en condiciones de flujo fisiológico;
 - (ix) se fija a al menos un residuo de aminoácido seleccionado de: T7, E8, A9, M10, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, N105, E107, R108, S110, K111, K112 y K113 de E-selectina humana;
 - (x) tiene una viscosidad de alrededor de 38 +/- 7 cP a una concentración de alrededor de 187 mg/ml a 25 °C;
 - (xi) tiene una semivida de alrededor de 21,5 días (518 horas) cuando se administra SC a una dosis de 3 mg/kg;
 - (xii) muestra propiedades adecuadas de formulación, que incluyen un alto grado de estabilidad térmica y una agregación mínima a una concentración alta; y
 - (xiii) puede mostrar expresión y pureza reproducibles en condiciones de producción a gran escala.

[00196] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como K_D para la E-selectina humana soluble, que es menor o igual a 200 nM, por ejemplo, menor o igual a 195 nM, 190 nM, 180 nM, 160 nM, 140 nM, 120 nM, 110 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 75 nM, 50 nM. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como K_D para la E-selectina humana soluble, que es menor o igual a 200 nM, según se mide mediante SPR. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o un fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como K_D para la E-selectina humana soluble, de alrededor de 61,8 a alrededor de 68,4 +/- 3,18 nM según se mide, por ejemplo, mediante SPR.

[00197] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como K_D para la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble, que es menor o igual a 200 nM, por ejemplo, menor o igual a 195 nM, 190 nM, 180 nM, 160 nM, 140 nM, 120 nM, 110 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 75 nM, 50 nM. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o un fragmento de

fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como K_D para la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble, de alrededor de 64,9 +/- 1,13 nM a alrededor de 81,5 nM según se mide, por ejemplo, mediante SPR.

[00198] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la E-selectina humana expresada en la superficie celular, que es menor o igual a 50 nM, por ejemplo, menor o igual a 48 nM, 45 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,75 nM, 0,5 nM, 0,25 nM o 0,1 nM, según se mide, por ejemplo, mediante FACS. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o un fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la E-selectina humana expresada en la superficie celular, de alrededor de 0,66 nM, según se mide, por ejemplo, mediante FACS.

[00199] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular, que es menor o igual a 50 nM, por ejemplo, menor o igual a 48 nM, 45 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,75 nM, 0,5 nM, 0,25 nM o 0,1 nM, según se mide, por ejemplo, mediante FACS. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o un fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular, de alrededor de 0,75 nM, según se mide, por ejemplo, mediante FACS.

[00200] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una afinidad de fijación, expresada como EC_{50} para la P-selectina humana expresada en la superficie celular, que es mayor o igual a 350 nM, por ejemplo, mayor o igual a 400 nM, 450 nM, 500 nM, 550 nM, 600 nM, 650 nM o más, según se mide, por ejemplo, mediante FACS.

[00201] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una fijación débil, o ninguna en absoluto, a la E-selectina de rata, ratón o conejo soluble o la L- o P-selectina humana soluble. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, no muestra fijación a la E-selectina de rata, ratón o conejo soluble o la L- o P-selectina humana soluble hasta 405 nM, según se mide, por ejemplo, mediante SPR. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-

selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, muestra una fijación no saturable débil (por ejemplo, >100x menor) a la E-selectina de ratón o rata soluble hasta 133,3 nM, según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de fijación directa.

[00202] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina humana soluble con una EC₅₀ menor o igual a 2 nM, por ejemplo, menor o igual a 0,010 nM, 0,015 nM, 0,020 nM, 0,025 nM, 0,030 nM, 0,035 nM, 0,040 nM, 0,045 nM, 0,05 nM, 0,055 nM, 0,06 nM, 0,065 nM, 0,070 nM, 0,075 nM, 0,080 nM, 0,085 nM, 0,090 nM, 0,10 nM, 0,12 nM, 0,15 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 0,9 nM, 0,95 nM, 1 nM, 1,5 nM, 1,8 nM o 1,9 nM. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina humana soluble con una EC₅₀ de alrededor de 0,085 nM a alrededor de 0,12 según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de fijación directa.

[00203] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana soluble con una EC₅₀ menor o igual a 2 nM, por ejemplo, menor o igual a 0,010 nM, 0,015 nM, 0,020 nM, 0,025 nM, 0,030 nM, 0,035 nM, 0,040 nM, 0,045 nM, 0,05 nM, 0,055 nM, 0,06 nM, 0,065 nM, 0,070 nM, 0,075 nM, 0,080 nM, 0,085 nM, 0,090 nM, 0,10 nM, 0,12 nM, 0,15 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 0,9 nM, 0,95 nM, 1 nM, 1,5 nM, 1,8 nM o 1,9 nM, según se mide, por ejemplo, mediante un ensayo de competencia homogéneo AlphaLisA.

[00204] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una EC₅₀ menor o igual a 1 nM, por ejemplo, menor o igual a 0,010 nM, 0,015 nM, 0,020 nM, 0,025 nM, 0,030 nM, 0,035 nM, 0,040 nM, 0,045 nM, 0,05 nM, 0,055 nM, 0,06 nM, 0,065 nM, 0,070 nM, 0,075 nM, 0,080 nM, 0,085 nM, 0,090 nM, 0,10 nM, 0,12 nM, 0,15 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 0,9 nM o 0,95 nM. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o un fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una EC₅₀ de 0,071 nM a 0,093 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de fijación directa.

[00205] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a la E-selectina humana soluble libre en suero humano con una IC₅₀ de alrededor de 1 nM a alrededor de 3 nM, y preferentemente con una IC₅₀ de alrededor de 1,2 nM.

[00206] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ de alrededor de 2,87 nM a alrededor de 3,01 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

[00207] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* soluble con una IC₅₀ de alrededor de 2,39 nM a alrededor de 2,91 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

[00208] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 50 nM, por ejemplo, menor o igual a 48 nM, 45 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 1,88 nM a alrededor de 2,89 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

[00209] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM,

70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, neutraliza la fijación de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 1,47 nM a alrededor de 2,65 nM según se mide, por ejemplo, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas.

[00210] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones estáticas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 3,36 nM a alrededor de 4,7 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones estáticas.

[00211] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 3,84 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones estáticas.

[00212] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ menor o igual a 100 nM, por ejemplo, menor o igual a 95 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos

sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 4,25 nM a alrededor de 4,56 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

[00213] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular con una IC₅₀ de alrededor de 4,32 nM a alrededor de 4,35 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

[00214] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ menor o igual a 300 nM, por ejemplo, menor o igual a 290 nM, 280 nM, 270 nM, 260 nM, 250 nM, 150 nM, 100 nM, 90 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 20 nM, 20 nM, 5 nM, 2 nM o 1 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ de alrededor de 13,28 nM a alrededor de 15,94 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

[00215] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de neutrófilos humanos activados a la E-selectina humana expresada en la superficie celular, o de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie celular, con una IC₅₀ de alrededor de 2,87 nM a alrededor de 4,65 nM o de 9,45 nM a alrededor de 16,33 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico. En algunas formas de realización, los neutrófilos son activados por TNF- α .

[00216] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, inhibe la adhesión de las células sanguíneas de pacientes con SCD a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ de alrededor de 6,17 nM a alrededor de 18,66 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al

antígeno de este, inhibe la adhesión de las células sanguíneas de pacientes con SCD a la E-selectina humana soluble con una IC₅₀ de alrededor de 12,4 nM según se mide, por ejemplo, en condiciones de flujo fisiológico.

[00217] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos uno de los tres epítomos de E-selectina humana según se determina mediante, por ejemplo, un ensayo de competencia con, por ejemplo, un biosensor Octet.

[00218] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a al menos un, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más residuos de aminoácidos de la E-selectina humana seleccionados del grupo que consiste en T7, E8, A9, M10, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, N105, E107, R108, S110, K111, K112, K113 y una combinación de estos, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00219] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con los residuos de aminoácidos T7, E8, A9, M10, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, N105, E107, R108, S110, K111, K112 y K113 de la E-selectina humana, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00220] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más residuos de aminoácidos de la E-selectina humana dentro de 3,8 Å seleccionados del grupo que consiste en T7, E8, A9, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E92, Y94, N105, E107, R108, S110, K111, K112 y una combinación de estos, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00221] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con los residuos de aminoácidos T7, E8, A9, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E92, Y94, N105, E107, R108, S110, K111 y K112 de la E-selectina humana dentro de 3,8 Å, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00222] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más residuos de aminoácidos de la E-selectina humana con un área de

superficie enterrada ($\text{\AA}^2$) de $>5 \text{ \AA}^2$ seleccionados del grupo que consiste en T7, E8, A9, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, E107, R108, S110, K111, K112, K113 y una combinación de estos, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00223] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con los residuos de aminoácidos T7, E8, A9, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, E107, R108, S110, K111, K112 y K113 de la E-selectina humana con un área de superficie enterrada ($\text{\AA}^2$) de $>5 \text{ \AA}^2$, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00224] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa, a través de un enlace de hidrógeno, con al menos un, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más residuos de aminoácidos de la E-selectina humana seleccionados del grupo que consiste en E8, S47, N82, N83, E88, E92, Y94, N105, E107, R108, S110, K112 y una combinación de estos, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00225] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con los residuos de aminoácidos E8, S47, N82, N83, E88, E92, Y94, N105, E107, R108, S110 y K112 de la E-selectina humana a través de un enlace de hidrógeno, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00226] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa, a través de un puente salino, con al menos un residuo de aminoácido de la E-selectina humana seleccionado del grupo que consiste en K111, K112 y una combinación de estos, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00227] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con los residuos de aminoácidos K111 y K112 de la E-selectina humana a través de un puente salino, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00228] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa, a través de un enlace de hidrógeno mediado por agua, con al menos un residuo de aminoácido de la E-selectina humana seleccionado del grupo que consiste en R97, K112 y una combinación de estos, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00229] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con los residuos de aminoácidos R97 y K112 de la E-selectina humana a través de un enlace de hidrógeno mediado por agua, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00230] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con al menos un, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o más residuos de aminoácidos de la E-selectina humana que también interactúan dentro de 3,8 Å con un contacto de residuo de aminoácido sLex seleccionado del grupo que consiste en Y48, N82, N83, E92, Y94, R97, N105, E107 y una combinación de estos, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00231] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, interactúa con los residuos de aminoácidos Y48, N82, N83, E92, Y94, R97, N105 y E107 de la E-selectina humana que también interactúan dentro de 3,8 Å con un contacto de residuo de aminoácido sLex, opcionalmente, de acuerdo con la estructura de cristal.

[00232] La fijación o interacción de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, con al menos un residuo de aminoácido de la E-selectina humana, o más, puede determinarse de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica, que incluyen el análisis de una estructura de cristal de las moléculas fijadas como se describe en los Ejemplos de la presente.

[00233] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene bajo riesgo de polirreactividad, según se mide, por ejemplo, mediante un ensayo AC-SINS, un ensayo de fijación a ADN y/o un ensayo de fijación a insulina. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene un bajo riesgo de inmunogenicidad, por ejemplo, tiene una puntuación ajustada en función de T-reg de alrededor de -44, -45, -46 o -47.

[00234] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, demostró al menos un parámetro de farmacocinética (PK) humano previsto, cuando se administró IV, elegido de: (i) una depuración sistémica de alrededor de 0,15 ml/h/kg a alrededor de 0,39 ml/h/kg; (ii) un volumen aparente de distribución en estado estacionario de 22 ml/kg a 36 ml/kg; (iii) una media de semivida de alrededor de 102 horas a alrededor de 345 horas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación

al antígeno de este, administrado SC muestra una semivida de alrededor de 243 a alrededor de 518 horas.

[00235] En algunas formas de realización, la media de semivida de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es de al menos alrededor de 102 horas (alrededor de 4,25 días) tras la administración IV a una dosis de 0,3 mg/kg. En algunas formas de realización, la media de semivida de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es de al menos alrededor de 264 horas (alrededor de 11 días) tras la administración IV a una dosis de 0,6 mg/kg. En algunas formas de realización, la media de semivida de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es de al menos alrededor de 188 horas (alrededor de 7,8 días) tras la administración IV a una dosis de 1,0 mg/kg. En algunas formas de realización, la media de semivida de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es de al menos alrededor de 345 horas (alrededor de 14,4 días) tras la administración IV a una dosis de 10 mg/kg.

[00236] En algunas formas de realización, la media de semivida de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es de al menos alrededor de 243 horas (alrededor de 10 días) tras la administración SC a una dosis de 1,0 mg/kg. En algunas formas de realización, la media de semivida de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es de al menos alrededor de 518 horas (alrededor de 21,5 días) tras la administración SC a una dosis de 3,0 mg/kg.

[00237] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una viscosidad seleccionada del grupo que consiste en alrededor de 7,97 +/- 1,83 cP a una concentración de alrededor de 23 mg/ml, alrededor de 12,38 +/- 5,28 cP a una concentración de alrededor de 48 mg/ml, alrededor de 4,26 +/- 0,6 cP a una concentración de alrededor de 90 mg/ml, alrededor de 5,58 +/- 0,99 cP a una concentración de alrededor de 102 mg/ml, alrededor de 8,44 +/- 1,54 cP a una concentración de alrededor de 121 mg/ml, alrededor de 9,78 +/- 2,32 cP a una concentración de alrededor de 140 mg/ml, alrededor de 17,47 +/- 3,24 cP a una concentración de alrededor de 158 mg/ml y alrededor de 37,99 +/- 7,03 cP a una concentración de alrededor de 188 mg/ml, cuando se mide a 25 °C mediante, por ejemplo, dispersión de luz dinámica (DLS).

[00238] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una viscosidad de alrededor de 15 cP a 40 cP a una concentración de alrededor de 150 mg/ml a alrededor de 190 mg/ml

cuando se mide a 25 °C mediante, por ejemplo, DLS.

[00239] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una viscosidad de 33,4 cP a 185,7 mg/ml cuando se mide a 25 °C mediante, por ejemplo, un método Anton Parr.

Inmunogenicidad

[00240] La inmunogenicidad es una barrera principal contra el desarrollo y el uso de agentes terapéuticos de proteínas, que incluyen anticuerpos y proteínas de fusión Fc. Varios factores pueden contribuir a la inmunogenicidad de las proteínas, incluso, entre otros, la secuencia de proteínas, la vía y frecuencia de administración y la población de pacientes. Si bien las respuestas inmunitarias son por lo general más severas ante las proteínas no humanas, tales como anticuerpos murinos, incluso los agentes terapéuticos con un contenido que es totalmente o en su mayoría secuencia humana pueden ser inmunogénicos. La inmunogenicidad es una serie compleja de respuestas a una sustancia que se percibe como extraña y puede incluir la producción de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, formación de complejos inmunitarios, activación del complemento, activación de mastocitos, inflamación y anafilaxis. Las respuestas inmunitarias no deseadas pueden reducir la eficacia de los agentes terapéuticos de anticuerpo y proteína de fusión Fc al interferir directamente con el reconocimiento del antígeno, alterar las interacciones con las moléculas efectoras o perturbar la semivida en suero o la distribución en los tejidos del agente terapéutico.

[00241] Los agentes terapéuticos de proteínas pueden analizarse para predecir la presencia de epítomos inmunogénicos potenciales mediante servicios disponibles en el comercio tales como los proporcionados por Epivax, Inc. de Providence, R.I. También se pueden predecir epítomos inmunogénicos potenciales mediante métodos tales como el método de consenso de IEDB. En algunas formas de realización, los algoritmos *in silico* pueden predecir los epítomos que se fijan a las moléculas de MHC de clase II. El análisis de un conjunto de datos del polipéptido con tales algoritmos proporciona epítomos previstos. Los epítomos previstos se usan para elaborar péptidos preparados mediante métodos estándar de síntesis automatizada de péptidos o técnicas de ADN recombinante. La información de puntuación proporcionada por Epivax puede proporcionar un indicio de la propagación reconocida de un epítomo previsto en la población. Una puntuación menor predice un menor potencial inmunogénico.

[00242] Como se usa en la presente, "T-regítomos" son secuencias de

aminoácidos dentro de la región marco de anticuerpo monoclonal que pueden activar potencialmente los linfocitos T reguladores naturales y reducir las respuestas inmunitarias no deseadas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, comprende 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 epítomos de linfocitos T que no son de línea germinal. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene un bajo riesgo de inmunogenicidad, por ejemplo, tiene una puntuación ajustada en función de T-reg de alrededor de -45,11, -45,32, -46,16 o -46,26. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, tiene una puntuación ajustada en función de T-reg de alrededor de -45,11 y 0 epítomos de linfocitos T que no son de línea germinal.

Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-E-selectina

[00243] La divulgación también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos de la invención, incluso las porciones de anticuerpos y los anticuerpos modificados descritos en la presente. La invención también proporciona un método para elaborar cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Los polinucleótidos pueden elaborarse y las proteínas pueden expresarse mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

[00244] Se puede determinar una secuencia de un anticuerpo deseado, o fragmento de fijación al antígeno de este, y un ácido nucleico que codifica tal anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, mediante técnicas de secuenciación estándar. Se puede insertar una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo deseado, o fragmento de fijación al antígeno de este, en diversos vectores (tales como vectores de expresión y clonación) para la caracterización y producción recombinante. Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada, o un fragmento de fijación al antígeno de la cadena pesada, y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana, o un fragmento de fijación al antígeno de la cadena liviana, pueden clonarse en el mismo vector o en vectores diferentes.

[00245] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de cualquiera de los siguientes anticuerpos anti-E-selectina y fragmentos de fijación al antígeno de estos: anticuerpo 1444, 0841, 0978, 0164, 1448, 1284, 1282, 0525, 0039, 0265_0254, 0158, 0929_548, 0159, 0955_0300, 0170, 0564, 0180 y 0027. En una forma de realización, la invención proporciona polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos del

anticuerpo anti-E-selectina 1444 y fragmentos de fijación al antígeno de este.

[00246] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de HC de anticuerpo anti-E-selectina que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 7, 13, 22, 28, 34, 37, 40, 43, 51, 59, 62, 74, 76, 89, 91, 103, 110, 117 y 124. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de HC de anticuerpo anti-E-selectina que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13.

[00247] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de LC de anticuerpo anti-E-selectina que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 17, 26, 31, 46, 56, 67, 72, 81, 86, 96, 101, 105, 115 y 119. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de LC de anticuerpo anti-E-selectina que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[00248] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de dominio VH de anticuerpo anti-E-selectina que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de dominio VH de anticuerpo anti-E-selectina que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

[00249] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de dominio VL de anticuerpo anti-E-selectina que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 7, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de dominio VL de anticuerpo anti-E-selectina que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

[00250] La invención proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529, que codifica el dominio de HC del anticuerpo 1444. La invención también proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos

nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530, que codifica la LC del anticuerpo 1444. Además, la invención proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADN del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529, que codifica el dominio VH del anticuerpo 1444. La invención proporciona además un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530, que codifica el dominio VL del anticuerpo 1444.

[00251] La invención también proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529, que codifica la HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 del anticuerpo 1444 y la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530, que codifica la LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 del anticuerpo 1444.

[00252] La invención también proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529, que codifica el dominio VH del anticuerpo 1444 y la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530, que codifica el dominio VL del anticuerpo 1444.

[00253] La invención también proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529, que codifica la cadena pesada del anticuerpo 1444 y la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530, que codifica la cadena liviana del anticuerpo 1444.

[00254] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona polinucleótidos y variantes de estos que codifican un anticuerpo anti-E-selectina, en donde tales variantes de polinucleótidos comparten al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 87 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos divulgadas en la Tabla 2. Estas cantidades no pretenden ser limitativas y los aumentos entre los porcentajes indicados están contemplados específicamente como parte de la divulgación.

[00255] En una forma de realización, los dominios VH y VL, o fragmento de fijación al antígeno de estos, o HC o LC de longitud completa, son codificados por polinucleótidos distintos. De manera alternativa, tanto VH como VL, o fragmento de fijación al antígeno de estos, o HC y LC, son codificados por un solo polinucleótido.

[00256] La presente divulgación también abarca polinucleótidos complementarios de cualquiera de dichas secuencias. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, cADN o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de HnARN, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de manera individual, y moléculas de mARN que no contienen intrones. Otras secuencias codificantes o no codificantes pueden estar presentes, aunque no necesariamente, en un polinucleótido de la presente divulgación, y un polinucleótido puede estar ligado, aunque no necesariamente, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

[00257] Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo o un fragmento de este o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones y/o inserciones, de manera que las características de fijación del polipéptido codificado no disminuyen con respecto a una molécula de anticuerpo nativo. El efecto sobre las características de fijación del polipéptido codificado por la variante de secuencia de ácidos nucleicos puede evaluarse en general como se describe en la presente. En algunas formas de realización, las variantes de polinucleótidos exhiben al menos alrededor de 70 % de identidad, al menos alrededor de 80 % de identidad, al menos alrededor de 90 % de identidad, al menos alrededor de 95 % de identidad, al menos 98 % de identidad o al menos 99 % de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo original (parental) que no comprende ninguna sustitución, adición, eliminación y/o inserción, o un fragmento de este. Estos porcentajes de identidad no pretenden ser limitativos y los aumentos entre los porcentajes indicados están contemplados específicamente como parte de la divulgación.

[00258] Se considera que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es igual cuando se alinea para tener una máxima correspondencia, como se describe en la presente. Por lo general, las comparaciones entre dos secuencias se realizan comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Como se usa en la presente, una

"ventana de comparación" se refiere a un segmento que tiene al menos alrededor de 20 posiciones contiguas, por lo general, de 30 a alrededor de 75 o de 40 a alrededor de 50, en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia que tenga la misma cantidad de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias. En algunas formas de realización, un polinucleótido es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % idéntico a un polinucleótido divulgado en la presente.

[00259] En algunas formas de realización, un dominio VL de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 137, 145, 147, 149, 154, 165, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172 y 174. En algunas formas de realización, un dominio VL de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 137, 145, 147, 149, 154, 165, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172 y 174.

[00260] En algunas formas de realización, un dominio VL de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 137. En algunas formas de realización, un dominio VL de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un polinucleótido que comprende, o consiste en, una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 137.

[00261] En algunas formas de realización, un dominio VH de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 136, 144, 146, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171 y 173. En algunas formas de realización, un dominio VH de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 136, 144, 146, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171 y 173.

[00262] En algunas formas de realización, un dominio VH de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 136. En algunas formas de realización, un dominio VH de anticuerpo anti-E-selectina es codificado por un

polinucleótido que comprende, o consiste en, una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 136.

[00263] En algunas formas de realización, una HC de anticuerpo anti-E-selectina es codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 206 o 207. En algunas formas de realización, una HC de anticuerpo anti-E-selectina es codificada por un polinucleótido que comprende, o consiste en, una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 206 o 138.

[00264] En algunas formas de realización, una LC de anticuerpo anti-E-selectina es codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 139. En algunas formas de realización, una LC de anticuerpo anti-E-selectina es codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 139.

[00265] De manera adicional o alternativa, las variantes de polinucleótidos pueden ser sustancialmente homólogas a un gen o un fragmento o complemento de este. Tales variantes de polinucleótidos pueden hibridarse en condiciones moderadamente rigurosas a una secuencia de ADN natural que codifica un anticuerpo (o una secuencia complementaria).

[00266] Las "condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen el lavado previo en una solución de 5X SSC, 0,5 % de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a alrededor de 50 °C a 65 °C, 5X SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), durante la noche; luego, dos lavados a 65 °C durante 20 minutos, cada uno con 2 X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene 0,1 % de SDS.

[00267] Como se usan en la presente, las expresiones "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) usan baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/0,1 % de dodecilsulfato de sodio a 50 °C; (2) usan durante la hibridación un agente de desnaturalización, tal como formamida, por ejemplo, 50 % (v/v) de formamida con 0,1 % de albúmina de suero bovino/0,1 % de Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) usan 50 % de formamida, 5X SSC, fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, 5X solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonido (50 µg/ml), 0,1 % de SDS y 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2X SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50 % de formamida a 55 °C, seguido de un lavado de alta

rigurosidad que consiste en 0,1X SSC que contiene EDTA a 55 °C. Las personas del oficio de nivel medio sabrán cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

[00268] Las personas del oficio de nivel medio apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de un polipéptido descrito en la presente. Algunos de estos polinucleótidos presentan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Es decir, hay 64 codones diferentes para codificar 20 aminoácidos naturales, en donde algunos aminoácidos tienen múltiples codones que los codifican (por ejemplo, 6 codones diferentes codifican leucina). Por lo tanto, una gran cantidad de secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar la misma secuencia de proteínas, de modo que dos ácidos nucleicos que codificar la misma secuencia de aminoácidos de polipéptido pueden compartir una identidad de secuencia de ácidos nucleicos muy baja. Por lo tanto, la presente divulgación contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso del codón.

[00269] Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El mRNA y la proteína resultantes pueden tener una estructura o función alterada, pero no es necesario que así sea. Los alelos se pueden identificar mediante técnicas estándares (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias en base de datos).

[00270] Los polinucleótidos de la presente divulgación se pueden obtener mediante síntesis química, métodos recombinantes o PCR. En el estado de la técnica se conocen métodos de síntesis química de polinucleótidos, y no es necesario describirlos en detalle en la presente. Una persona del oficio de nivel medio puede usar las secuencias proporcionadas en la presente y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

[00271] Para preparar polinucleótidos mediante métodos recombinantes, se puede insertar un polinucleótido que comprende una secuencia deseada en un vector adecuado y, a su vez, el vector se puede introducir en una célula huésped adecuada para la replicación y amplificación, como se analiza adicionalmente en la presente. Se pueden insertar polinucleótidos en células huésped por medio de métodos conocidos

en el estado de la técnica. Las células se transforman mediante la introducción de un polinucleótido exógeno por absorción directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno se puede mantener dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de esta manera se puede aislar de la célula huésped mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989.

[00272] De manera alternativa, PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR es muy conocida en el estado de la técnica y se describe en las patentes estadounidenses N.º 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como en PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.* ed., Birkhäuser Press, Boston, 1994.

[00273] El ARN se puede obtener mediante el uso del ADN aislado en un vector adecuado y su inserción en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN se puede aislar mediante métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio, como se indica, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989.

[00274] Como se usa en la presente, el término "vector" significa un constructo que es capaz de administrar, y, preferentemente, expresar, uno o más genes o secuencias de interés (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una HC, LC, VH, VL y/o un fragmento de estos, de un anticuerpo anti-E-selectina) en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, entre otros, vectores virales (por ejemplo, AAV), vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores plásmidos, cósmidos o de fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados a agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucarióticas, tales como células productoras.

[00275] Los vectores de clonación y expresión adecuados pueden incluir una variedad de componentes, tales como secuencias promotoras y potenciadoras y otras secuencias reguladoras de la transcripción. El vector también puede construirse de modo de permitir la clonación posterior de un dominio variable de anticuerpo en diferentes vectores. Los vectores de clonación adecuados se pueden construir de acuerdo con técnicas estándares o se pueden seleccionar de una gran cantidad de vectores de clonación disponibles en el estado de la técnica. Si bien el vector de clonación seleccionado puede variar según la célula huésped que se pretende usar, por lo general, los vectores de clonación útiles tienen la capacidad de autorreplicarse,

pueden tener una única diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden tener genes para un marcador que se pueden usar para seleccionar clones que contengan el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN del fago y vectores transportadores, tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles a través de vendedores comerciales, tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

[00276] También se proporcionan vectores de expresión. Por lo general, los vectores de expresión son constructos de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la divulgación. Se sobreentiende que un vector de expresión debe poder replicarse en las células huésped como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, entre otros, plásmidos, vectores virales, incluso adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vectores de expresión divulgados en la publicación PCT N.º WO 87/04462. Por lo general, los componentes de los vectores incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción), por lo general, también se requieren uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de fijación a ribosomas, sitios de iniciación de la traducción y codones de detención.

[00277] En algunas formas de realización, una célula (por ejemplo, aislada o dentro de un organismo) se transduce con un AAV recombinante (rAAV) que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica un polinucleótido heterólogo (por ejemplo, una HC, una LC, un dominio VH, un dominio VL, o fragmento de fijación al antígeno de este, de un anticuerpo anti-E-selectina) y una cápside de AAV. Un ácido nucleico recombinante puede comprender además elementos reguladores (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un intrón, un exón, poliA) para la expresión del polinucleótido heterólogo dentro de una célula transducida. Un ácido nucleico recombinante puede comprender además secuencias virales de repetición en tándem invertida (ITR). En algunas formas de realización, una cápside de AAV es AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, o cualquier otra cápside de AAV de tipo silvestre o recombinante conocida en el estado de la técnica. Las secuencias de ITR pueden ser AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7,

AAV8, AAV9, AAV10 o cualquier otra secuencia de ITR de tipo silvestre o recombinante (por ejemplo, AAV2) conocida en el estado de la técnica. En algunas formas de realización, un rAAV comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una HC, una LC, un dominio VH, un dominio VL, o un fragmento de fijación al antígeno de este, de un anticuerpo anti-E-selectina, un promotor, una ITR de AAV y una cápside viral. Tal rAAV es adecuado para la expresión de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, en una célula para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección (por ejemplo, SCD) mediada por E-selectina en un sujeto (por ejemplo, un paciente).

[00278] Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés y/o los polinucleótidos en sí mismos se pueden introducir en una célula huésped mediante varios medios adecuados, que incluyen electroporación, transfección mediante cloruro de calcio o polietilenimina (PEI), cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso, tal como un virus vaccinia). Con frecuencia, la elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá de las características de la célula huésped.

[00279] En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 137, 145, 147, 149, 154, 165, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172 y 174. En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 137. En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende, o consiste en, una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 137.

[00280] En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 136, 144, 146, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171 y 173. En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 136. En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende, o consiste en, una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 136.

[00281] En algunas formas de realización, un vector comprende un

polinucleótido que comprende i) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 136; ii) un ácido nucleico de SEQ ID NO: 137; o iii) ambos.

[00282] En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 206 o 138. En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende, o consiste en, una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 206 o 138.

[00283] En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos al menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 139. En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende, o consiste en, una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 139.

[00284] En algunas formas de realización, un vector comprende un polinucleótido que comprende i) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 206 o 138; ii) un ácido nucleico de SEQ ID NO: 139; o iii) ambos.

[00285] Como se usan en la presente, las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se usan de manera indistinta y significan una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de un polinucleótido y/o vectores para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen "transformantes", "células transformadas" y "células transducidas", que incluyen la célula transformada o transducida primaria y la progenie derivada de esta independientemente de la cantidad de pases. La progenie de una célula huésped puede no ser necesariamente completamente idéntica (en términos de morfología o complemento de ADN genómico) a la célula de origen debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas. Una célula huésped incluye células transfectadas y/o transformadas *in vivo* con un polinucleótido de esta invención (por ejemplo, un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-E-selectina) o un vector que lo comprende.

[00286] Las células huésped pueden ser células procariotas o eucariotas. Las células eucariotas de ejemplo incluyen células de mamífero, tales como células animales de primate o no de primate; células fúngicas, tal como levadura; células vegetales; y células de insecto.

[00287] Un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede elaborarse de manera recombinante mediante el uso de una célula huésped adecuada. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento

de fijación al antígeno de este, de la presente divulgación puede clonarse en un vector de expresión, que puede luego introducirse en una célula huésped, donde la célula no produce de otro modo una proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de un anticuerpo en la célula huésped recombinante. Se puede utilizar cualquier célula huésped susceptible al cultivo celular, y a la expresión de proteína o polipéptidos, de acuerdo con la presente invención. En ciertas formas de realización, la célula huésped es de mamífero. En el estado de la técnica se conocen líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión y estas incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles a través de American Type Culture Collection (ATCC). Las células de mamífero de ejemplo no limitativas incluyen, entre otras, células NS0, células HEK 293 y células de ovario de hámster chino (CHO), y sus derivados, tales como células 293-6E y CHO DG44, CHO DXB11, y células Potelligent® CHOK1SV (BioWa/Lonza, Allendale, NJ). Las células huésped de mamífero también incluyen, entre otras, células de carcinoma del cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de riñón de mono (COS) y células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2). Otros ejemplos no limitativos de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen retinoblastos humanos (PER.C6®; CruCell, Leiden, Países Bajos); la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión (Graham *et al.*, J. Gen Virol. 1997; 36:59); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 1980; 23:243-251); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 1982; 383:44-68); células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2); y numerosas líneas celulares de mieloma, que incluyen, entre otras, línea de mieloma de ratón BALB/c (NS0/1, N.º de ECACC: 85110503), células NS0 y células Sp2/0.

[00288] Además, se puede utilizar cualquier cantidad de líneas celulares disponibles en el comercio y no disponibles en el comercio que expresen polipéptidos o proteínas de acuerdo con la presente invención. Una persona del oficio de nivel medio apreciará que diferentes líneas celulares podrían tener diferentes requisitos de

nutrición y/o podrían requerir diferentes condiciones de cultivo para un crecimiento y expresión de polipéptidos o proteínas óptimos, y será capaz de modificar las condiciones según sea necesario.

Usos

Métodos de tratamiento

[00289] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona métodos terapéuticos para reducir o inhibir la actividad de E-selectina mediante un anticuerpo anti-E-selectina o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el método terapéutico comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejora, alivia, inhibe o previene mediante la eliminación, inhibición o reducción de la actividad de la E-selectina (por ejemplo, SCD).

[00290] Los métodos de tratamiento con anticuerpos anti-E-selectina, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, incluyen, entre otros, métodos para tratar y/o prevenir enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con, o mediadas por, la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a un ligando (por ejemplo, determinantes sLex A y/o X), que incluyen, entre otros, SCD, crisis vasooclusiva, dolor, infarto de órganos, isquemia, apoplejía, disfunción de órganos vitales, síndrome torácico agudo y obstrucción vascular. Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este de la presente divulgación, también puede usarse para tratar y/o prevenir otras enfermedades, trastornos y afecciones tales como, enfermedades de la piel (por ejemplo, psoriasis), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide) y complicaciones de la diabetes.

[00291] La presente divulgación proporciona anticuerpos terapéuticos novedosos que se fijan específicamente a E-selectina y son capaces de neutralizar la actividad funcional de E-selectina. Estos anticuerpos pueden usarse ventajosamente para prevenir, o reducir los casos de, una VOC cuando se utilizan como tratamiento profiláctico para SCD. En algunas formas de realización, un caso de VOC en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se reduce en alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con un caso de VOC en un sujeto, o grupo de sujetos (por ejemplo, pacientes con SCD), no tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, un caso de VOC en un sujeto (por ejemplo, un paciente

con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se reduce en alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con un caso de VOC en el mismo sujeto antes del tratamiento con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, un caso de VOC en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, no es significativamente diferente a un caso de VOC en un sujeto, o población de sujetos, sin SCD. En algunas formas de realización, un caso de VOC (por ejemplo, cantidad de eventos de VOC) se mide durante un período de tiempo. En algunas formas de realización, un caso de VOC (por ejemplo, cantidad de eventos de VOC) se mide durante días, semanas, meses o años.

[00292] En algunas formas de realización, un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de la divulgación puede reducir una tasa anualizada de crisis de dolor relacionado con células falciformes. Las crisis de dolor relacionado con células falciformes, como se denominan en la presente, son episodios agudos de dolor, sin causa determinada médicamente distinta a un evento vasooclusivo, que pueden dar lugar a una visita a una instalación médica y/o que pueden dar lugar a un tratamiento con agentes narcóticos orales o parenterales o con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo parenteral. En algunas formas de realización, el síndrome torácico agudo, secuestro hepático, secuestro esplénico y priapismo se consideran crisis de dolor relacionado con células falciformes.

[00293] En algunas formas de realización, una tasa anualizada de crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % menor que una tasa anualizada de crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto, o grupo de sujetos (por ejemplo, pacientes con SCD), no tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una tasa anualizada de crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % menor que una tasa anualizada de crisis de dolor relacionado con células falciformes en el mismo sujeto antes del tratamiento con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una tasa anualizada de crisis de

dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, no es significativamente diferente a una tasa anualizada de crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto, o población de sujetos, sin SCD.

[00294] En algunas formas de realización, una mediana de tiempo hasta una primera crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor que una mediana de tiempo hasta una primera crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto, o grupo de sujetos (por ejemplo, pacientes con SCD), no tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una mediana de tiempo hasta una primera crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor que una mediana de tiempo hasta una primera crisis de dolor relacionado con células falciformes en el mismo sujeto antes del tratamiento con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una mediana de tiempo hasta una primera crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, no es significativamente diferente a una mediana de tiempo hasta una primera crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto, o población de sujetos, sin SCD.

[00295] En algunas formas de realización, una mediana de tiempo hasta una segunda crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor que una mediana de tiempo hasta una segunda crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto, o grupo de sujetos (por ejemplo, pacientes con SCD), no tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una mediana de tiempo hasta una segunda crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %,

20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor que una mediana de tiempo hasta una segunda crisis de dolor relacionado con células falciformes en el mismo sujeto antes del tratamiento con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una mediana de tiempo hasta una segunda crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, no es significativamente diferente a una mediana de tiempo hasta una segunda crisis de dolor relacionado con células falciformes en un sujeto, o población de sujetos, sin SCD.

[00296] En algunas formas de realización, una mediana de tasa de crisis de dolor relacionado con células falciformes sin complicaciones en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % menor que una mediana de tasa de crisis de dolor relacionado con células falciformes sin complicaciones en un sujeto, o grupo de sujetos (por ejemplo, pacientes con SCD), no tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una crisis sin complicaciones fue una crisis distinta a síndrome torácico agudo, secuestro hepático, secuestro esplénico y/o priapismo. En algunas formas de realización, una mediana de tasa de crisis de dolor relacionado con células falciformes sin complicaciones en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, es alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % mayor que una mediana de tasa de crisis de dolor relacionado con células falciformes sin complicaciones en el mismo sujeto antes del tratamiento con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una mediana de tasa de crisis de dolor relacionado con células falciformes sin complicaciones en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, no es significativamente diferente a una mediana de tasa de crisis de dolor relacionado con células falciformes sin complicaciones en un sujeto, o población de sujetos, sin SCD.

[00297] Los anticuerpos de la divulgación también pueden usarse ventajosamente para tratar una VOC aguda en un paciente con SCD al disminuir la duración (por ejemplo, reducción en el tiempo para resolver una VOC), gravedad y/o intensidad de una VOC. En algunas formas de realización, la duración, gravedad y/o

intensidad de una VOC en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se reduce en alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con la duración, gravedad y/o intensidad de una VOC en un sujeto, o grupo de sujetos (por ejemplo, pacientes con SCD), no tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, la duración, gravedad y/o intensidad de una VOC en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina se reduce en alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con la duración, gravedad y/o intensidad de una VOC en el mismo sujeto antes del tratamiento con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, la duración, gravedad y/o intensidad de una VOC en un sujeto (por ejemplo, un paciente con SCD) tratado con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, no es significativamente diferente a la duración, gravedad y/o intensidad de una VOC en un sujeto, o población de sujetos, sin SCD.

[00298] Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, también puede usarse para tratar, prevenir y/o mejorar al menos un signo y/o síntoma de SCD, por ejemplo, los que afectan el sistema cardiorrespiratorio (por ejemplo, enfermedad pulmonar restrictiva crónica, enfermedad diastólica del ventrículo izquierdo, hipertensión pulmonar, síndrome torácico agudo, disritmias, muerte súbita, crisis vasooclusiva), el sistema nervioso (por ejemplo, apoplejía hemorrágica, trombosis del seno venoso, infarto cerebral silencioso, dolor crónico, apoplejía isquémica aguda del cerebro, retinopatía proliferativa, infarto orbitario, deterioro cognitivo), el sistema reticuloendotelial (por ejemplo, secuestro esplénico, hipoesplenismo funcional, anemia, hemólisis), el sistema musculoesquelético (por ejemplo, necrosis avascular, ulceraciones cutáneas), el sistema urogenital (por ejemplo, necrosis papilar, proteinuria, insuficiencia renal, hematuria, enuresis nocturna, priapismo) y el sistema gastrointestinal (por ejemplo, colelitiasis, colangiopatía, hepatopatía, vasooclusión mesentérica).

[00299] En algunas formas de realización, la presente divulgación incluye un anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a la E-selectina y modula al menos una actividad biológica detectable de E-selectina de modo que el anticuerpo: (a) disminuye la unión de leucocitos a células endoteliales; (b) disminuye la activación de la adhesión estable a las células

endoteliales; (c) reduce el rodamiento lento de los leucocitos hasta detenerse; (d) reduce la migración transendotelial eficaz de los leucocitos; (e) disminuye la afinidad y avidéz de las integrinas CD18; (f) reduce el tráfico de leucocitos a sitios de inflamación aguda; (g) disminuye el calcio citosólico; (h) disminuye la fosforilación de tirosina que activa p38 MAP quinasa y Syk quinasa; (i) reduce el reclutamiento de plaquetas y leucocitos de la sangre al endotelio vascular; y/o (j) no crea un entorno proinflamatorio.

[00300] Los métodos de tratamiento con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, de la presente divulgación incluyen tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Si se administra un tratamiento antes de la manifestación clínica de una afección, se considera que el tratamiento es profiláctico. Por ejemplo, se puede usar la administración de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, para prevenir VOC (por ejemplo, reducir la frecuencia de eventos de VOC) cuando se utiliza como tratamiento profiláctico (por ejemplo, una o más dosis durante un período de tiempo) para SCD. El tratamiento terapéutico incluye, por ejemplo, mejorar o reducir la gravedad de una enfermedad, o acortar la duración de la enfermedad. Por ejemplo, se puede usar la administración de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, para tratar una VOC aguda en pacientes con SCD al disminuir la duración, intensidad y/o gravedad de la VOC.

[00301] En algunas formas de realización, un sujeto a tratar puede ser un mamífero y en particular un paciente humano, por ejemplo, un paciente con SCD. Un sujeto puede necesitar tratamiento porque, como resultado de una o más mutaciones en la secuencia codificante del gen HBB, la proteína β -globina se expresa de manera inadecuada, por ejemplo, tiene una secuencia de aminoácidos incorrecta. Se puede usar la administración de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD (por ejemplo, VOC), una variante de SCD o enfermedad de SC. Se puede usar la administración de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de enfermedad en un sujeto que tiene un genotipo variante de HBSS, HBSC, HBS/ β° thal, HBS/ β^{+} thal o HBS.

[00302] La divulgación abarca además un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica, como se define en la presente para su uso en los métodos definidos de tratamiento y/o prevención. En las formas de realización que se refieren a un método de tratamiento y/o prevención descrito en la presente, tales formas de realización también incluyen

formas de realización adicionales relacionadas con un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica, para su uso en ese tratamiento y/o prevención, o, de manera alternativa, para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir un síntoma de SCD.

Tratamientos conjuntos

[00303] Un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este de la presente divulgación, puede administrarse en combinación con uno o más compuestos o modalidades de tratamiento terapéuticamente activos adicionales que son eficaces para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD. La divulgación abarca un método de tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, en combinación con una cantidad de un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD. En algunas formas de realización, tratar un síntoma de SCD incluye disminuir la duración e intensidad de una VOC aguda. En algunas formas de realización, prevenir un síntoma de SCD incluye reducir la frecuencia de eventos de VOC.

[00304] La invención también abarca un método de tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, y una cantidad de un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD, en donde las cantidades son, en conjunto, eficaces para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD.

[00305] En otra forma de realización, la invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad de un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, y una cantidad de un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD, en donde las cantidades logran, en conjunto, efectos sinérgicos en el tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD, es decir, la combinación es "sinérgica" (es decir, la combinación proporciona un efecto mayor que un efecto meramente aditivo de dos o más tratamientos individuales). Tales tratamientos conjuntos sinérgicos pueden utilizar

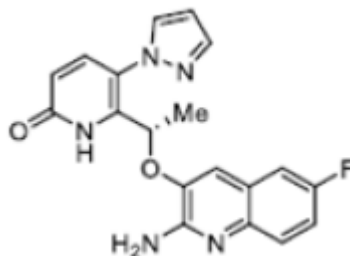
ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, con lo cual se evitan posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

[00306] Otros compuestos terapéuticamente activos útiles para el tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD incluyen, por ejemplo, profilaxis de penicilina para prevenir la infección por neumococo, hidroxiurea (por ejemplo, DROXIA, HYDREA), L-glutamina (por ejemplo, ENDARI), crizanlizumab (ADAKVEO), voxelotor (OXBRYTA), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico, generalmente un analgésico opioide, IW-1701, riociguat (ADEMPAS), ticagrelor (BRILINTA), memantina (NAMENDA) y una combinación de estos.

[00307] Otros compuestos terapéuticamente activos útiles para el tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD incluyen compuestos tales como un anticuerpo anti-P-selectina (por ejemplo, crizanlizumab (ADAKVEO)), un compuesto que modula HbS, un compuesto que modula la afinidad al oxígeno de HbS (por ejemplo, voxelotor (OXBRYTA)), un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al modular la generación de ácido 2,3-difosfoglicérico, un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al inducir la expresión de hemoglobina fetal (HbF) (por ejemplo, hidroxiurea), un compuesto que se dirige a la adhesión celular disfuncional, la disfunción vascular y/o la inflamación (por ejemplo, un inhibidor de fosfodiesterasa-9), un compuesto que aumenta los niveles de óxido nítrico en la sangre (por ejemplo, estimuladores de guanilato ciclasa soluble, por ejemplo, IW-1701, riociguat (ADEMPAS)), IG intravenosa, un compuesto que se dirige a la hipercoagulabilidad (por ejemplo, riociguat (ADEMPAS), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO)), un compuesto que bloquea la fijación al receptor NMDA (por ejemplo, memantina (NAMENDA)).

[00308] Otro compuesto terapéuticamente activo útil para el tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD (por ejemplo, una VOC) es un compuesto que modula HbS para mantenerla en su estado R (es decir, estado oxigenado), tal como los descritos en WO 2020/109994 e incorporados en la presente por referencia. En algunas formas de realización, un compuesto que modula HbS para mantenerla en su estado R incluye un compuesto de 2-aminoquinolina. En algunas formas de realización, un compuesto que modula HbS para mantenerla en su estado R es 6-((1S)-1-[(2-amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi]etil)-5-(1H-pirazol-1-il)piridin-2-ol, preparado opcionalmente en forma sólida como su tautómero de amida (S)-6-(1-((2-

amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi)etil)-5-(1H-pirazol-1-il)piridin-2(1H)-ona,



[00309] Una modalidad de tratamiento terapéuticamente activo útil para el tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD incluye suplemento de oxígeno, transfusión de sangre, opcionalmente con quelación de hierro, trasplante de médula ósea, tratamiento génico (por ejemplo, LentiGlobin®), un tratamiento de edición de genes mediante CRISPR (por ejemplo, CTX001), una técnica de dedos de zinc y una combinación de estos.

[00310] La presente divulgación abarca una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico para su uso en el tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD (por ejemplo, VOC). La divulgación abarca una composición farmacéutica que comprende una cantidad sinérgica y terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina, una cantidad sinérgica y terapéuticamente eficaz de un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD, y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico para su uso en el tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD (por ejemplo, VOC). La composición puede comprender además un agente terapéutico adicional, tal como, entre otros, al menos otro compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD (por ejemplo, VOC).

[00311] Una persona del oficio de nivel medio entendería, en función de la divulgación proporcionada, que el método de tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD abarca administrar una cantidad sinérgica y terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina y una cantidad sinérgica y terapéuticamente eficaz de un compuesto o modalidad de tratamiento

terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD a un paciente ya sea tratado previamente con, o que recibe actualmente, al menos un agente terapéutico adicional para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD (por ejemplo, VOC).

[00312] Tal agente terapéutico adicional abarca un agente que es un tratamiento de referencia para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD. Es decir, el tratamiento conjunto de la invención puede agregarse al régimen terapéutico de un paciente con SCD que ya está recibiendo un tratamiento diferente, que incluye, entre otros, L-glutamina, hidroxurea, una transfusión de sangre (opcionalmente con quelación de hierro) y cualquier otro tratamiento conocido en el estado de la técnica.

[00313] Las personas del oficio de nivel medio serán capaces de determinar, de acuerdo con métodos conocidos, la cantidad o dosis adecuada de cada compuesto, como se usa en la combinación de la presente divulgación, a administrar a un paciente con SCD, tomando en cuenta factores tales como la edad, el peso, la salud general, el compuesto administrado, la vía de administración, la naturaleza y el progreso del tratamiento contra la SCD y la presencia de otros medicamentos.

[00314] Un agente profiláctico o terapéutico de los tratamientos conjuntos, incluso un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica (por ejemplo, los tratamientos se formulan conjuntamente). De manera alternativa, un agente profiláctico o terapéutico de los tratamientos conjuntos puede administrarse de manera concurrente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas (por ejemplo, los tratamientos se administran conjuntamente). El agente profiláctico o terapéutico de los tratamientos conjuntos pueden administrarse de acuerdo con el mismo régimen de dosis (por ejemplo, ambos tratamientos se administran diariamente) o de acuerdo con diferentes regímenes de dosis (por ejemplo, un tratamiento se administra diariamente y el otro tratamiento se administra semanalmente). Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por la misma vía de administración o por vías de administración diferentes.

[00315] Un agente profiláctico o terapéutico de los tratamientos conjuntos, incluso un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, y 6-{{(1S)-1-[(2-amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi]etil}-5-(1H-pirazol-1-il)piridin-2-ol, preparado opcionalmente en forma sólida como su tautómero de amida (S)-6-(1-[(2-amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi]etil)-5-(1H-pirazol-1-il)piridin-2(1H)-ona, puede administrarse de manera concurrente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas (por

ejemplo, los tratamientos se administran conjuntamente). Tal agente profiláctico o terapéutico de los tratamientos conjuntos pueden administrarse de acuerdo con el mismo régimen de dosis (por ejemplo, ambos tratamientos se administran diariamente) o de acuerdo con diferentes regímenes de dosis (por ejemplo, un tratamiento se administra diariamente y el otro tratamiento se administra semanalmente). Además, tales agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por la misma vía de administración o por vías de administración diferentes.

[00316] Los agentes profilácticos o terapéuticos, incluso un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, y 6-{{(1S)-1-[(2-amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi]etil}-5-(1H-pirazol-1-il)piridin-2-ol, preparado opcionalmente en forma sólida como su tautómero de amida (S)-6-(1-[(2-amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi]etil)-5-(1H-pirazol-1-il)piridin-2(1H)-ona, pueden administrarse en combinación para reducir la duración (por ejemplo, reducción en el tiempo para resolver una VOC), gravedad y/o intensidad de una VOC, para reducir una tasa anualizada de crisis de dolor relacionado con células falciformes, para aumentar la mediana de tiempo hasta una primera crisis de dolor relacionado con células falciformes, para aumentar la mediana de tiempo hasta una segunda crisis de dolor relacionado con células falciformes y/o para reducir la mediana de tasa de crisis de dolor relacionado con células falciforme sin complicaciones en un sujeto.

[00317] La divulgación abarca además un agente profiláctico o terapéutico de los tratamientos conjuntos, incluso un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, como se define en la presente para su uso en los métodos definidos de tratamiento y/o prevención. En las formas de realización que se refieren a un método de tratamiento y/o prevención descrito en la presente, tales formas de realización también incluyen formas de realización adicionales relacionadas con un tratamiento conjunto, que incluye un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica, para su uso en ese tratamiento y/o prevención, o, de manera alternativa, para la fabricación de un medicamento para su uso en ese tratamiento y/o prevención de al menos un signo y/o síntoma de SCD.

[00318] La divulgación proporciona protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos contra E-selectina, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, de la divulgación sola o en combinación con otros tratamientos a un sujeto que lo necesite. Los tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de los tratamientos conjuntos de la presente

divulgación pueden administrarse de manera concomitante o secuencial a un sujeto. El tratamiento (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de los tratamientos conjuntos de la presente divulgación también pueden administrarse de manera cíclica. El tratamiento cíclico implica la administración de un primer tratamiento (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguida de la administración de un segundo tratamiento (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo, para reducir el desarrollo de resistencia a uno de los tratamientos (por ejemplo, agentes) a fin de evitar o reducir los efectos secundarios de uno de los tratamientos (por ejemplo, agentes) y/o mejorar la eficacia de los tratamientos.

[00319] Los tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de los tratamientos conjuntos de la divulgación pueden administrarse a un sujeto de manera concurrente. La expresión "de manera concurrente" no se limita a la administración de tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que se refiere a que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos contra E-selectina, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, de la divulgación se administra a un sujeto en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos de la divulgación o sus conjugados puedan actuar junto con los otros tratamientos para proporcionar un mayor beneficio que si se administraran de otra manera. Por ejemplo, cada tratamiento puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos temporales; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse con una diferencia de tiempo suficientemente corta para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada tratamiento puede administrarse a un sujeto por separado, de cualquier forma adecuada y mediante cualquier vía adecuada. En diversas formas de realización, los tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto con menos de 15 minutos, menos de 30 minutos o menos de 1 hora de diferencia, con alrededor de 1 hora de diferencia, de alrededor de 1 hora a alrededor de 2 horas de diferencia, de alrededor de 2 horas a alrededor de 3 horas de diferencia, de alrededor de 3 horas a alrededor de 4 horas de diferencia, de alrededor de 4 horas a alrededor de 5 horas de diferencia, de alrededor de 5 horas a alrededor de 6 horas de diferencia, de alrededor de 6 horas a alrededor de 7 horas de diferencia, de alrededor de 7 horas a alrededor de 8 horas de diferencia, de alrededor de 8 horas a alrededor de 9 horas de diferencia, de alrededor de 9 horas

a alrededor de 10 horas de diferencia, de alrededor de 10 horas a alrededor de 11 horas de diferencia, de alrededor de 11 horas a alrededor de 12 horas de diferencia, con alrededor de 24 horas de diferencia, 48 horas de diferencia, 72 horas de diferencia o 1 semana de diferencia. En otras formas de realización, se administran dos o más tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) en una misma visita del paciente.

[00320] Los agentes profilácticos o terapéuticos de un tratamiento conjunto pueden administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. De manera alternativa, un agente profiláctico o terapéutico de un tratamiento conjunto puede administrarse de manera concurrente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por la misma vía de administración o por vías de administración diferentes.

Usos de diagnóstico

[00321] Los anticuerpos anti-E-selectina, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención tienen usos *in vitro* e *in vivo*, los cuales incluyen inmunoensayos y el uso para el diagnóstico y la evaluación del tratamiento de los trastornos mediados por E-selectina. Los métodos son particularmente adecuados para el diagnóstico, evaluación y tratamiento de pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la existencia de E-selectina. Estos trastornos asociados con la existencia de E-selectina incluyen, entre otros, SCD, enfermedades de la piel (por ejemplo, psoriasis), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide) y complicaciones de la diabetes.

[00322] La invención proporciona un método para detectar la presencia de E-selectina en una muestra, en donde el método comprende poner una muestra que se cree que comprende E-selectina en contacto con un anticuerpo específico contra E-selectina y detectar la presencia de E-selectina fijada con el anticuerpo, con lo cual se detecta la E-selectina en la muestra. En la técnica se conocen métodos para detectar la E-selectina fijada con el anticuerpo y estos incluyen, entre otros, un ensayo donde la E-selectina está fijada a un soporte sólido y a esto se agrega una muestra, lo que permite que el anticuerpo se fije a la E-selectina en la muestra. Se agrega un segundo anticuerpo contra E-selectina que es igual o distinto al anticuerpo fijado al soporte sólido y este puede detectarse mediante etiquetado directo (es decir, el segundo anticuerpo se conjuga con una etiqueta detectable) o mediante la adición de un tercer anticuerpo, por ejemplo, de otra especie que reacciona con el dominio constante del segundo anticuerpo y que comprende una etiqueta detectable. Por lo tanto, el ensayo

puede usarse para detectar la presencia o ausencia de E-selectina en una muestra.

[00323] La invención también proporciona un método para determinar la concentración de E-selectina en una muestra, en donde dicho método comprende proporcionar un competidor etiquetado que comprende E-selectina acoplada a una etiqueta detectable; proporcionar un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina; combinar la muestra, el anticuerpo y el competidor etiquetado, en donde la E-selectina en la muestra compite con el competidor etiquetado por la fijación al anticuerpo; y determinar la concentración de E-selectina en dicha muestra al medir la cantidad de competidor etiquetado no fijado al anticuerpo mediante detección de la etiqueta. La cantidad de competidor etiquetado fijado al anticuerpo en ausencia de la muestra se compara con la cantidad de competidor etiquetado fijado al anticuerpo cuando se agrega la muestra. La cantidad de disminución del competidor etiquetado y fijado en presencia de la muestra es un indicador de la cantidad de E-selectina no etiquetada presente en la muestra, de modo que el ensayo puede usarse para evaluar la presencia y el nivel de E-selectina en una muestra. En algunas formas de realización, E-selectina es E-selectina soluble. En algunas formas de realización, E-selectina es E-selectina fijada a la membrana.

[00324] En una forma de realización, la invención proporciona un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad o un trastorno asociado con un nivel aumentado de E-selectina en un sujeto, en donde el método comprende administrar un tratamiento al sujeto y comparar el nivel de E-selectina en una muestra obtenida del sujeto antes del tratamiento con el nivel de E-selectina en una muestra por lo demás idéntica obtenida del sujeto después del tratamiento, en donde el nivel de E-selectina en una muestra se evalúa mediante el uso de un anticuerpo específico contra E-selectina, y además en donde un nivel más bajo de E-selectina en la muestra recolectada del sujeto después del tratamiento en comparación con el nivel de E-selectina en una muestra recolectada del sujeto antes del tratamiento es un indicio de la eficacia del transcurso del tratamiento.

[00325] El término "etiquetado", con respecto al anticuerpo específico contra E-selectina o competidor etiquetado, incluye el etiquetado directo al acoplar (es decir, al ligar físicamente) una sustancia detectable al anticuerpo o al competidor etiquetado, así como el etiquetado indirecto del anticuerpo o competidor etiquetado al acoplarlo con otro reactivo directamente etiquetado. Un ejemplo de etiquetado indirecto incluye la detección de un anticuerpo primario mediante el uso de un anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de un polipéptido

de la invención incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia.

[00326] El término "muestra" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos (por ejemplo, sangre, CSF, orina, etc.) aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto.

[00327] Los anticuerpos, los competidores etiquetados y los compuestos terapéuticos potenciales descritos en la presente también son adecuados para su uso con cualquiera de varios otros inmunoensayos homogéneos y heterogéneos con una variedad de sistemas de detección.

Composiciones

[00328] Un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, de la divulgación se puede formular como una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender además un portador, excipiente y/o estabilizador aceptable desde el punto de vista farmacéutico (Remington: The Science and practice of Pharmacy, 21.^a ed., 2005, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en la forma de formulación liofilizada o solución acuosa. Como se usan en la presente, la expresión "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" o "excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente retenga la actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto.

[00329] Los ejemplos incluyen, entre otros, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar tales como solución salina amortiguada con fosfato (PBS), agua, solución salina normal (0,9 %), emulsiones (por ejemplo, emulsiones de aceite/agua) y varios tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la administración en aerosol o parenteral son PBS y solución salina normal.

[00330] Los portadores, excipientes o estabilizantes adecuados no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y pueden comprender amortiguadores, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol de fenol, butilo o bencilo; parabenos de alquilo, tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina,

histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, que incluyen glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™, polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80 (PS80), polisorbato 60 (PS60), polisorbato 20 (PS20)) o polietilenglicol (PEG). Los excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico se describen adicionalmente en la presente.

[00331] Los compuestos farmacéuticos de la divulgación pueden incluir una o más sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de estas sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas que derivan de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básica incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

[00332] Una composición farmacéutica de la divulgación también puede incluir un antioxidante aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de antioxidantes aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

[00333] Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina,

manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos.

[00334] Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulgentes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que demoran la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

[00335] Por lo general, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para obtener una concentración farmacológica alta. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y usando tensioactivos. En muchos casos, será adecuado incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede provocar al incluir en la composición un agente que demora la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[00336] Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar mediante la incorporación de la cantidad necesaria de compuesto activo en un solvente adecuado con un ingrediente o una combinación de ingredientes antes enumerados, según sea necesario, y la posterior esterilización microfiltrada.

[00337] Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los que se enumeraron anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos de preparación preferidos incluyen secado al vacío y secado por congelación (liofilización), que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier

ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de estos.

[00338] Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede prepararse, empaquetarse o comercializarse en una formulación adecuada para la administración oftálmica. Tales formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de gotas oftálmicas que incluyen, por ejemplo, una solución o suspensión al 0,1-1,0 % (p/p) del ingrediente activo en un portador líquido acuoso u oleoso. Las gotas también pueden comprender agentes amortiguadores, sales o uno o más de otros ingredientes adicionales descritos en la presente. Otras formulaciones útiles que se pueden administrar oftálmicamente incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina o en una preparación liposómica.

[00339] Como se usa en la presente, la expresión "ingredientes adicionales" incluye, entre otros, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes granulantes y desintegrantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes endulzantes; agentes saborizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables, tales como gelatina; vehículos acuosos y solventes; vehículos oleosos y solventes; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulgentes, demulcentes; amortiguadores; agentes espesantes; agentes de relleno; agentes emulgentes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes y materiales poliméricos o hidrófobos aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Otros "ingredientes adicionales" que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de la divulgación se conocen en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1985), que se incorpora en la presente por referencia.

[00340] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se formula en un vial que contiene 100 mg de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, en 1 ml de una solución acuosa amortiguada. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se formula en un vial que contiene 150 mg de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, en 1 ml de una solución acuosa amortiguada. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se formula en un vial que contiene 15 mg, 40 mg, 100 mg, 300 mg o 600 mg de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este,

en 1 ml de una solución acuosa amortiguada, opcionalmente para la administración subcutánea. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se formula en un vial que contiene 500 mg de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, en 1 ml de una solución acuosa amortiguada, opcionalmente para la administración intravenosa.

[00341] En algunas formas de realización, una composición farmacéutica comprende alrededor de 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml de anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una composición farmacéutica comprende alrededor de 100 mg/ml de anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una composición farmacéutica adecuada para la administración SC y/o IV comprende alrededor de 100 mg/ml de anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este.

[00342] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se administra en una formulación intravenosa o subcutánea como una solución acuosa estéril que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se administra en una formulación intravenosa o subcutánea como una solución acuosa estéril que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, se administra en una formulación intravenosa o subcutánea como una solución acuosa estéril que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1.

[00343] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444), o fragmento de fijación al antígeno de este, se administra como una formulación intravenosa o subcutánea que es una solución acuosa estéril que contiene alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 15 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml de anticuerpo, alrededor de 25 mg/ml, alrededor de 50 mg/ml, alrededor de 75 mg/ml, alrededor de 100 mg/ml, alrededor de 125 mg/ml o alrededor de 150 mg/ml de anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, una formulación intravenosa o subcutánea es una solución

acuosa estéril que comprende acetato de sodio, polisorbato 80 y cloruro de sodio a un pH que varía de alrededor de 5 a 6. En algunas formas de realización, una formulación intravenosa es una solución acuosa estéril que contiene 5 o 10 mg/ml de anticuerpo, con acetato de sodio 20 mM, 0,2 mg/ml de polisorbato 80 y cloruro de sodio 140 mM a pH 5,5. Además, una solución que comprende un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede comprender, entre muchos otros compuestos, ácido glutámico, histidina, manitol, sacarosa, trehalosa, glicina, polietilenglicol, EDTA, metionina, polisorbato 80 y cualquier combinación de estos, y muchos otros compuestos conocidos en el estado de la técnica relevante.

[00344] En una forma de realización, una composición farmacéutica de la presente divulgación comprende los siguientes componentes: 50 mg/ml o 100 mg/ml de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444) o fragmento de fijación al antígeno de la presente divulgación, histidina 20 mM, 8,5 % de sacarosa, y 0,02 % de polisorbato 80, 0,005 % de EDTA a pH 5,8. En una forma de realización, una composición farmacéutica de la presente invención comprende los siguientes componentes: 100 mg/ml de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, anticuerpo 1444) o fragmento de fijación al antígeno de la presente divulgación, histidina 10 mM, 5 % de sacarosa, y 0,01 % de polisorbato 80 a pH 5,8.

[00345] En algunas formas de realización, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este (por ejemplo, anticuerpo 1444), a una concentración de 100 mg/ml, 1,12 mg/ml de L-histidina, 2,67 mg/ml de L-histidina clorhidrato monohidrato, 85 mg/ml de sacarosa, 0,05 mg/ml de edetato disódico dihidrato y 0,2 mg/ml de polisorbato 80 a pH 5,8 en un volumen de llenado nominal de 1,0 ml. Tal composición farmacéutica es adecuada para la administración subcutánea o intravenosa.

[00346] Tales composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar como una formulación líquida o como un polvo liofilizado. Cuando se reconstituye un polvo a todo su volumen, la composición conserva la misma formulación. Alternativamente, se puede reconstituir un polvo a la mitad del volumen, en cuyo caso la composición comprende los mismos componentes pero al doble de concentración.

[00347] Con respecto a un agente terapéutico, en donde el agente es, por ejemplo, una pequeña molécula a ser utilizada en un tratamiento conjunto, puede estar presente en una composición farmacéutica en forma de un éster o una sal aceptable desde el punto de vista fisiológico, tal como en combinación con un catión o anión aceptable desde el punto de vista fisiológico, como se conocen en el estado de la

técnica.

[00348] Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden preparar mediante cualquier método conocido o desarrollado en el futuro en el estado de la técnica de la farmacología. En general, los métodos de preparación incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo al portador o uno o más ingredientes complementarios, y luego, si es necesario o conveniente, dar forma al producto o envasarlo en dosis unitarias o en dosis múltiples.

[00349] En algunas formas de realización, una composición de la divulgación es una formulación libre de pirógenos que está sustancialmente libre de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas al interior de un microorganismo y se liberan cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirogénicas también incluyen sustancias termoestables que inducen la fiebre (glucoproteínas) de la membrana exterior de la bacteria y otros microorganismos. Estas sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y choque si se administran a seres humanos. Debido a los posibles efectos perjudiciales, es conveniente retirar incluso las cantidades bajas de endotoxinas de las soluciones farmacológicas farmacéuticas que se administran por vía intravenosa. La Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration, "FDA") estableció un límite superior de 5 unidades de endotoxinas (EU) por dosis por kilogramo de peso corporal en un período de una sola hora para aplicaciones farmacológicas intravenosas (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando las proteínas terapéuticas se administran en cantidades de varios cientos o miles de miligramos por kilogramo de peso corporal, es conveniente retirar incluso las cantidades mínimas de endotoxina. En una forma de realización, los niveles de endotoxina y pirógeno en la composición son menores de 10 EU/mg, menores de 5 EU/mg, menores de 1 EU/mg, menores de 0,1 EU/mg, menores de 0,01 EU/mg o menores de 0,001 EU/mg. En otra forma de realización, los niveles de endotoxina y pirógeno en la composición son menores de alrededor de 10 EU/mg, menores de alrededor de 5 EU/mg, menores de alrededor de 1 EU/mg, menores de alrededor de 0,1 EU/mg, menores de alrededor de 0,01 EU/mg o menores de alrededor de 0,001 EU/mg.

Dosis y administración

[00350] Para preparar una composición farmacéutica o estéril que incluye un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, de la divulgación, el anticuerpo se mezcla con un portador o excipiente aceptable desde el

punto de vista farmacéutico (ver párrafos anteriores). Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden preparar mezclándolas con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (VER, por ejemplo, Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N. Y.; Avis, *et al.* (ed.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (ed.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (ed.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.).

[00351] Seleccionar un régimen de administración de un agente terapéutico depende de varios factores, que incluyen la tasa de producción de suero o tejido de la entidad, el nivel de un síntoma, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En ciertas formas de realización, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico administrado depende, en parte, de la entidad particular y de la gravedad de la afección que se trate. Hay disponibles ciertas pautas para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas (ver, por ejemplo, Wawrzynczak, 1996, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.), 1991, Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Bach (ed.), 1993, Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Baert, *et al.*, New Engl. J. Med. 2003; 348:601-608; Milgrom, *et al.*, New Engl. J. Med. 1999; 341:1966-1973; Slamon, *et al.*, New Engl. J. Med. 2001; 344:783-792; Beniaminovitz, *et al.*, New Engl. J. Med. 2000; 342:613-619; Ghosh, *et al.*, New Engl. J. Med. 2003; 348:24-32; Lipsky, *et al.*, New Engl. J. Med. 2000; 343:1594-1602).

[00352] La dosis adecuada es determinada por un médico, por ejemplo, mediante parámetros o factores que se sabe o se cree en el estado de la técnica que afectan el tratamiento o que se prevé afectarán el tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad un poco menor que la dosis óptima y aumenta de a poco hasta alcanzar el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Un protocolo de dosis específica puede ser aquel que comprende la dosis

máxima o la frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados significativos.

[00353] "Reducir, disminuir, neutralizar o inhibir la interacción con E-selectina", como se usan los términos en la presente, significa reducir, disminuir, neutralizar o inhibir la interacción de E-selectina con un ligando en comparación con el nivel de interacción antes de cualquier intervención terapéutica. Como se usa en la presente, "E-selectina libre" significa E-selectina que no está fijada o de otro modo en un complejo con otra molécula (por ejemplo, un ligando de E-selectina libre o expresado en la superficie celular).

[00354] El nivel de E-selectina incluye el nivel de E-selectina libre en un sujeto donde el nivel se evalúa mediante los métodos divulgados en la presente o cualquier otro método para evaluar el nivel de E-selectina libre conocido en el estado de la técnica.

[00355] En una forma de realización, se reduce un nivel de E-selectina libre en comparación con el nivel de E-selectina en un sujeto antes de la administración de un anticuerpo anti-E-selectina de la divulgación. En una forma de realización, se reduce un nivel de E-selectina libre en comparación con un nivel estándar de E-selectina libre que está asociado con o indica que un sujeto padece una enfermedad, un trastorno o una afección asociada con o mediada por E-selectina libre.

[00356] En algunas formas de realización, la divulgación abarca reducir el nivel de E-selectina libre a un nivel en donde hay una disminución, o una falta completa, de efectos perjudiciales detectables mediados por o asociados con E-selectina libre. En algunas forma de realización, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina para neutralizar la actividad funcional de la E-selectina, tal como (a) unión de leucocitos a células endoteliales; (b) activación de la adhesión estable a las células endoteliales; (c) rodamiento lento de los leucocitos hasta detenerse; (d) migración transendotelial de leucocitos; (e) afinidad y avidéz de las integrinas CD18; (f) tráfico de leucocitos a sitios de inflamación aguda; (g) aumento del calcio citosólico; (h) aumento de la fosforilación de tirosina que activa p38 MAP quinasa y Syk quinasa; (i) reclutamiento de plaquetas y leucocitos de la sangre al endotelio vascular; y/o (j) no crea un entorno proinflamatorio.

[00357] Como se usa en la presente, una "dosificación eficaz", "dosis eficaz", "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr uno o más resultados beneficiosos o deseados. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o

deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, reducir la frecuencia de casos (por ejemplo, durante un período de tiempo, por ejemplo, semanal, mensual, anual), disminuir la gravedad y/o retrasar la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para el uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos detectables tales como reducir o disminuir la tasa de VOC o reducir uno o más síntomas resultantes de la expresión de E-selectina, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otro medicamento y/o retrasar la progresión de la enfermedad de los pacientes. Una dosis eficaz se puede administrar en una o más administraciones. A los fines de la presente invención, una dosis eficaz de un fármaco, un compuesto o una composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se sabe en el ámbito clínico, una dosis eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por ello, una "dosis eficaz" se puede considerar en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y un solo agente se puede considerar administrado en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

[00358] En algunas formas de realización, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina a un paciente con SCD, enfermedades de la piel (por ejemplo, psoriasis), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide) y complicaciones de la diabetes.

[00359] En algunas formas de realización, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444) para tratar y/o prevenir enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con, o mediadas por, la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a un ligando (por ejemplo, determinantes sLex A y/o X), que incluyen, entre otros, SCD, crisis vasooclusiva, dolor, infarto de órganos, isquemia, apoplejía, disfunción de órganos vitales, síndrome torácico agudo y obstrucción vascular.

[00360] En algunas formas de realización, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444) para prevenir o reducir la aparición de una VOC cuando se utiliza como tratamiento profiláctico para SCD. En algunas formas de realización, la administración profiláctica de un anticuerpo anti-E-

selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444) se administra una vez. En algunas formas de realización, la administración profiláctica de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444) se administra de forma continua (por ejemplo, una o más dosis, durante un período de tiempo).

[00361] En algunas formas de realización, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444) para tratar VOC aguda en pacientes con SCD al disminuir la duración, intensidad y/o gravedad de la VOC.

[00362] En algunas formas de realización, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444) para tratar, prevenir y/o mejorar al menos un signo y/o síntoma de SCD, por ejemplo, los que afectan el sistema cardiorrespiratorio (por ejemplo, enfermedad pulmonar restrictiva crónica, enfermedad diastólica del ventrículo izquierdo, hipertensión pulmonar, síndrome torácico agudo, disritmias, muerte súbita, crisis vasooclusiva), el sistema nervioso (por ejemplo, apoplejía hemorrágica, trombosis del seno venoso, infarto cerebral silencioso, dolor crónico, apoplejía isquémica aguda del cerebro, retinopatía proliferativa, infarto orbitario, deterioro cognitivo), el sistema reticuloendotelial (por ejemplo, secuestro esplénico, hipoesplenismo funcional, anemia, hemólisis), el sistema musculoesquelético (por ejemplo, necrosis avascular, ulceraciones cutáneas), el sistema urogenital (por ejemplo, necrosis papilar, proteinuria, insuficiencia renal, hematuria, enuresis nocturna, priapismo) y el sistema gastrointestinal (por ejemplo, colelitiasis, colangiopatía, hepatopatía, vasooclusión mesentérica).

[00363] En algunas formas de realización, el método o uso comprende administrar una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 800 mg. En algunas formas de realización, el método o uso comprende administrar una dosis de alrededor de 1 mg a 800 mg como una dosis fija inicial. En algunas formas de realización, el método o uso comprende la administración de una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 2 mg, de alrededor de 2 mg a alrededor de 5 mg, de alrededor de 5 mg a alrededor de 10 mg, de alrededor de 10 mg a alrededor de 20 mg, de alrededor de 20 mg a alrededor de 30 mg, de alrededor de 30 mg a alrededor de 40 mg, de alrededor de 40 mg a alrededor de 50 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 60 mg, de alrededor de 60 mg a alrededor de 70 mg, de alrededor de 70 mg a alrededor de 80 mg, de alrededor de 80 mg a alrededor de 90 mg, de alrededor de 90 mg a alrededor de 100 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 150 mg, de alrededor de 150 mg a alrededor de 200 mg, de alrededor de 200 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 300 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 500 mg, de

alrededor de 500 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 600 mg a alrededor de 700 mg o de alrededor de 700 mg a alrededor de 800 mg, opcionalmente como una dosis fija inicial. En algunas formas de realización, el método o uso comprende administrar una dosis de alrededor de 15 mg, 40 mg, 100 mg, 150 mg, 300 mg, 500 mg o 600 mg de un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica de este, de la invención. En algunas formas de realización, la dosis es una dosis fija inicial.

[00364] En algunas formas de realización, el método o uso comprende administrar una dosis de alrededor de 150 mg de un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica de este, de la invención. En algunas formas de realización, el método o uso comprende administrar una dosis de alrededor de 150 mg de un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica de este, de la invención una vez por semana. En algunas formas de realización, el método o uso comprende administrar una dosis de alrededor de 150 mg de un anticuerpo anti-E-selectina (por ejemplo, el anticuerpo 1444), o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica de este, de la invención, por vía subcutánea, una vez por semana.

[00365] En algunas formas de realización, el método o uso comprende administrar una dosis de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg de un anticuerpo, o un fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica de la invención, opcionalmente como una dosis inicial. La dosis inicial puede ir seguida de una o más dosis posteriores. En algunas formas de realización, se pueden administrar una o más dosis posteriores al menos en cualquiera de una vez por semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas, cada ocho semanas, cada nueve semanas, cada diez semanas, cada once semanas o cada doce semanas.

[00366] Una dosis inicial puede ir seguida de una o más dosis posteriores. En algunas formas de realización, una dosis posterior es la misma dosis, una dosis menor o una dosis mayor de anticuerpo anti-E-selectina en comparación con la dosis inicial. En algunas formas de realización, se pueden administrar una o más dosis posteriores al menos en cualquiera de una vez por semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas, cada ocho semanas, cada nueve semanas, cada diez semanas, cada once semanas o cada doce semanas. Un protocolo de dosis específica es aquel que

comprende la dosis máxima o la frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados significativos.

[00367] Una composición farmacéutica de la presente divulgación también puede administrarse a través de una o más vías de administración mediante uno o más de una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica. La persona del oficio de nivel medio considerará que la vía de administración y/o el modo de administración variarán en función de los resultados deseados. Las vías de administración seleccionadas para los anticuerpos de la divulgación incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluye, entre otros, administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e inyección e infusión intraesternal. Alternativamente, una composición de la divulgación puede administrarse a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

[00368] En algunas formas de realización, se administra por vía intravenosa un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este de la divulgación. En algunas formas de realización, se administra por vía subcutánea un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este de la divulgación.

[00369] En algunas formas de realización, se administra por vía intravenosa o subcutánea un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este de la divulgación una vez por semana. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, de la divulgación se administra a una dosis unitaria de alrededor de 15 mg, alrededor de 40 mg, alrededor de 100 mg, alrededor de 150 mg, alrededor de 300 mg o alrededor de 600 mg por vía subcutánea una vez por semana. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, de la divulgación se administra a una dosis unitaria de alrededor de 150 mg o alrededor de 500 mg por vía intravenosa una vez por semana.

[00370] En algunas formas de realización, a un sujeto se le administra un

anticuerpo anti-E-selectina, o fragmentos de fijación al antígeno de este, de la divulgación una vez por semana y un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de una enfermedad (por ejemplo, SCD) una vez por día, semanalmente, quincenalmente, mensualmente o según sea necesario. La divulgación proporciona protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos contra anti-E-selectina, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, de la divulgación sola o en combinación con otros tratamientos a un sujeto que lo necesite. Los tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de los tratamientos conjuntos de la presente divulgación pueden administrarse de manera concomitante o secuencial a un sujeto. El tratamiento (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de los tratamientos conjuntos de la presente divulgación también pueden administrarse de manera cíclica.

[00371] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, o una composición farmacéutica que lo comprende, se administra alrededor de dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, dos veces por mes, una vez por mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses o una vez cada doce meses.

[00372] En algunas formas de realización, parte de una dosis se administra mediante un bolo intravenoso y el resto de la dosis se administra mediante infusión de la formulación del anticuerpo. Por ejemplo, una inyección intravenosa de 0,01 mg/kg del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, puede administrarse como un bolo, y el resto de la dosis de anticuerpo puede administrarse mediante inyección intravenosa. Se puede administrar una dosis predeterminada del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, por ejemplo, durante un período de una hora y media a dos horas a cinco horas.

[00373] Cuando sea necesario, la composición también podrá incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Además, también se puede emplear la administración pulmonar, por

ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y una formulación con un agente aerosolizante. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las publicaciones PCT N.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Kits

[00374] La divulgación también proporciona un kit que comprende cualquiera o todos los anticuerpos anti-E-selectina o fragmentos de fijación al antígeno de estos descritos en la presente. Un kit de la divulgación incluye uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, descrito en la presente e instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la divulgación descritos en la presente. En general, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración de un anticuerpo para los tratamientos terapéuticos anteriormente descritos. En algunas formas de realización, se proporciona un kit para producir una unidad de administración de dosis única. En algunas formas de realización, un kit puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína deshidratada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En determinadas formas de realización, se incluye un kit que contiene un aplicador, por ejemplo, un dispositivo o jeringa precargada de una o varias cámaras (por ejemplo, jeringas líquidas y liojeringas).

[00375] En algunas formas de realización, un kit contiene un aplicador que comprende un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el aplicador está diseñado o es aceptable para la autoadministración por un paciente (por ejemplo, un paciente con SCD). En algunas formas de realización, la autoadministración es por administración subcutánea.

[00376] Las instrucciones relacionadas con el uso de un anticuerpo anti-E-selectina, o un fragmento de fijación al antígeno de este, generalmente incluyen información sobre la dosis, el cronograma de dosificación y la vía de administración (por ejemplo, SC o IV) para el tratamiento previsto. Un recipiente puede ser una dosis unitaria, un envase a granel (por ejemplo, un envase multidosis) o una dosis subunitaria. En general, las instrucciones provistas en un kit de la divulgación son instrucciones escritas en una etiqueta o un prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también se aceptan instrucciones en formato legible por máquina (por ejemplo, instrucciones incluidas en un disco de almacenamiento óptico o

magnético).

[00377] Un kit de esta divulgación está en un envase adecuado. El envase adecuado incluye, entre otros, un vial, botella, frasco, envases flexibles (por ejemplo, bolsas de tereftalato de polietileno o de plástico), y similares. También se contemplan envases para usar en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo para la administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión, tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, un recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). Un recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, un recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-E-selectina de la divulgación. Un recipiente puede comprender además un agente terapéutico adicional.

[00378] En una forma de realización, la invención incluye un kit que comprende además un segundo compuesto, o modalidad de tratamiento, terapéuticamente activo que es eficaz para tratar o prevenir los síntomas de SCD, en donde la cantidad del anticuerpo anti-E-selectina y el segundo compuesto o modalidad juntos logran efectos sinérgicos en el tratamiento o la prevención de los síntomas de SCD, es decir, la combinación es "sinérgica" (es decir, la combinación proporciona un efecto mayor que un efecto meramente aditivo de dos o más tratamientos individuales). Tal kit que comprende tratamientos conjuntos sinérgicos puede utilizar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, con lo cual se evitan posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

[00379] En algunas formas de realización, un kit puede comprender además al menos un compuesto terapéuticamente activo adicional útil para el tratamiento o la prevención de un signo y/o síntoma de SCD, que incluye, por ejemplo, penicilina, hidroxiurea (por ejemplo, DROXIA, HYDREA), L-glutamina (por ejemplo, ENDARI), crizanlizumab (ADAKVEO), voxelotor (OXBRYTA), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico, generalmente un analgésico opioide, IW-1701, riociguat (ADEMPAS), ticagrelor (BRILINTA) o memantina (NAMENDA).

[00380] Un kit puede proporcionar opcionalmente componentes adicionales, tales como un amortiguador e información interpretativa. Habitualmente, un kit comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en el recipiente, o que se

asocia al recipiente.

[00381] La divulgación también proporciona un kit de diagnóstico que comprende cualquiera o todos los anticuerpos anti-E-selectina, o fragmentos de fijación al antígeno de estos, descritos en la presente. Un kit de diagnóstico es útil para, por ejemplo, detectar la presencia de E-selectina en una muestra. En algunas formas de realización, se puede usar un kit de diagnóstico para identificar un individuo con una enfermedad, un trastorno o una afección latentes que podrían ponerlo en riesgo de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por E-selectina. En algunas formas de realización, puede usarse un kit de diagnóstico para detectar la presencia y/o el nivel de E-selectina en un individuo que se cree que tiene una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por E-selectina.

[00382] Los kits de diagnóstico de la divulgación incluyen uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, descrito en la presente e instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la divulgación descritos en la presente. Generalmente, las instrucciones comprenden una descripción del uso de un anticuerpo contra E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, para detectar la presencia de E-selectina en individuos con riesgo o sospecha de tener una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por E-selectina, tal como una VOC en un paciente que se cree o se sabe que padece SCD o cualquier otra afección asociada con o mediada por una forma anormal de β -globina, que incluye: HbS, HbC, Hb β^+ -talasemia, Hb β° -talasemia u otra variante de Hb. En algunas formas de realización, se puede configurar un kit de diagnóstico de ejemplo para que contenga reactivos tales como, por ejemplo, un anticuerpo contra E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este, una muestra de control negativa, una muestra de control positiva e instrucciones para usar el kit.

Depósitos biológicos

[00383] Las cadenas pesada y liviana del anticuerpo anti-E-selectina 1444 se depositaron de conformidad con los términos del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE. UU., el 6 de diciembre de 2019.

Anticuerpo	Descripción	N.º de acceso a ATCC
1444	Ab 1444-HC (cadena pesada del anticuerpo 1444)	PTA-126529
1444	Ab 1444-LC (cadena liviana del anticuerpo 1444)	PTA-126530

[00384] Los depósitos se obtuvieron conforme las cláusulas del Tratado de

Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes y regulaciones afines (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito estará disponible por medio de ATCC conforme los términos del Tratado de Budapest, y estará sujeto a un acuerdo entre Pfizer, Inc. y ATCC, lo que garantiza la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo de depósito al público al momento de la emisión de la patente estadounidense correspondiente, o de revelar al público cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, lo que suceda primero, y garantiza la disponibilidad de la progenie a quien determine el Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos que tendrá derecho a ello de acuerdo con el Artículo 122 del Título 35 del Código de los Estados Unidos y las reglamentaciones del Comisionado al respecto (incluido el Artículo 1.14 del Título 37 del Código de Reglamentaciones Federales, con particular referencia a 886 OG 638).

[00385] El cesionario de la presente solicitud acordó que si un cultivo de los materiales en depósito se muere, se pierde o se destruye cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán rápidamente al momento de la notificación. La disponibilidad del material depositado no deberá interpretarse como una licencia para practicar la invención en contra de los derechos otorgados por la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes sobre patentes.

Técnicas generales

[00386] Cabe destacar que la presente invención no se limita a métodos de realización de síntesis específicos que, por supuesto, pueden variar. A menos que se defina de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos que se usan con respecto a la presente invención tendrán el significado que les otorgan habitualmente las personas del oficio de nivel medio. Además, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos en singular incluirán el plural, y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas que se usan y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación que se describen en la presente son las que se conocen y se usan habitualmente en el estado de la técnica.

[00387] En la práctica de la presente invención, se usarán, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro del ámbito de las personas del oficio de nivel medio. Estas

técnicas se explican en detalle en la literatura, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, ed., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, ed.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, ed., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, ed., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, ed., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, ed., 1991); Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Coligan *et al.*, *Short Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY (2003); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd y C. Dean, ed., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J.D. Capra, ed., Harwood Academic Publishers, 1995).

[00388] Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se llevan a cabo habitualmente en el estado de la técnica o se describen en la presente. La nomenclatura que se usa, y las técnicas y los procedimientos de laboratorio de química analítica, bioquímica, inmunología, biología molecular, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica que se describen en la presente son los que se conocen y se usan habitualmente en el estado de la técnica. Se usan técnicas estándares para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y el suministro, y para el tratamiento de pacientes.

EQUIVALENTES

[00389] La descripción anterior y los siguientes Ejemplos detallan ciertas formas

de realización específicas de la divulgación y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, independientemente del nivel de detalle del texto que antecede, la invención se puede poner en práctica de varias maneras y debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de estas.

[00390] Si bien las explicaciones se describieron con referencia a varias solicitudes, métodos, kits y composiciones, se debe tener en cuenta que se pueden hacer varios cambios y modificaciones sin apartarse de las enseñanzas en la presente y de la divulgación que se reivindica a continuación. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor las explicaciones descritas y no pretenden limitar el alcance de las enseñanzas que se brindan en la presente. Si bien las explicaciones de la presente se describieron en términos de estas formas de realización ilustrativas, la persona del oficio de nivel medio comprenderá con facilidad que es posible realizar muchas variaciones y modificaciones de estas formas de realización de ejemplo sin experimentación indebida. Todas esas variaciones y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las explicaciones actuales.

[00391] Todas las referencias citadas en la presente, lo que incluye patentes, solicitudes de patentes, documentos, libros de texto y similares, y las referencias allí citadas, se incorporan en la presente como referencia en su totalidad, en la medida en que no se hayan incorporado previamente. En el caso de que una o más de las literaturas incorporadas en la presente y materiales similares difieran de esta solicitud o la contradigan, lo que incluye, entre otros, los términos definidos, el uso de términos, las técnicas descritas o similares, prevalecerá la presente solicitud.

EJEMPLOS

[00392] A fin de facilitar la comprensión de la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo ilustrativos, y no debe interpretarse que limitan el alcance de la invención de modo alguno.

Ejemplo 1: Aislamiento de anticuerpos monoclonales de rata que se fijan a la E-selectina humana.

[00393] Se inmunizaron ratas Sprague Dawley con dominio extracelular de E-selectina humana soluble (residuos 22-556 de Uniprot P16581; SEQ ID NO: 133) mediante el uso de un método de inmunización IP de Rappid. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para determinar la fijación al dominio extracelular de E-selectina soluble humana (SEQ ID NO: 133) y de ratón (SEQ ID NO: 135) y E-selectina humana trunca (residuos 22-178 de UniProtKB P16581; SEQ ID NO: 197) y E-selectina

truncada de ratón (residuos 22-178 de UniProtKB Q00690; SEQ ID NO: 199) mediante el uso de HRP-ELISA de fijación directa. Del conjunto de aglutinantes, se seleccionaron 6 anticuerpos (0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180) que se fijaron a E-selectina humana soluble y truncada y se seleccionó un anticuerpo (0027) que se fijó a E-selectina de ratón soluble y truncada. Estos siete anticuerpos se eligieron para la clonación molecular y el posterior análisis.

Ejemplo 2: Clonación de regiones variables de la cadena pesada y liviana de anticuerpo anti-E-selectina de rata.

[00394] Se clonaron regiones variables de la cadena pesada (HC) y cadena liviana (LC) de los anticuerpos anti-E-selectina que se fijaron a E-selectina humana (anticuerpos 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180) o E-selectina de ratón (anticuerpo 0027) mediante el uso del sistema de síntesis de cADN SMART® (Clontech Laboratories Inc. de Mountain View, California) seguido de amplificación por PCR. El cADN se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total aislado de aproximadamente 500.000 células de hibridoma (para cada clon 0027, 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180), mediante el uso del kit RNEasy (Qiagen) y el oligo SMART® IIA (Clontech Laboratories Inc.) con transcriptasa inversa Superscript™ III (Invitrogen). Luego, el cADN se amplificó mediante PCR mediante el uso de un cebador que se hibrida con la secuencia de oligonucleótidos SMART® IIA y el cebador específico de la región constante de rata (kappa de rata para la cadena liviana e IgG1 de rata para la cadena pesada) con Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Inc.). Los productos de PCR de la cadena pesada y de la cadena liviana se subclonaron en vector pCR4-TOPO (Invitrogen), y se determinó la secuencia de ácidos nucleicos. Este método es ventajoso porque no se requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN. Además, la secuencia de ADN resultante no se altera por el uso de cebadores de PCR degenerados.

[00395] Las regiones pesadas variables (VH para el anticuerpo 0039 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60), VH para el anticuerpo 0158 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75), VH para el anticuerpo 0159 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90), VH para el anticuerpo 0164 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35), VH para el anticuerpo 0170 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104), VH para el anticuerpo 0180 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118), y VH para el anticuerpo 0027 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128)) se clonaron en el vector de expresión de mamífero pTT5 que contenía la región constante de IgG1 humana que se había mutado para

eliminar la función efectora (Leu234Ala, Leu235Ala y Gly237Ala, numeración EU, patente estadounidense N.º 5.624.821) (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15), lo que produce cadenas pesadas quiméricas. Las regiones livianas variables (VL para el anticuerpo 0039 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57), VL para el anticuerpo 0158 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73), VL para el anticuerpo 0159 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87), VL para el anticuerpo 0164 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32), VL para el anticuerpo 0170 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102), VL para el anticuerpo 0180 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116) y VL para el anticuerpo 0027 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122)) se clonaron en los vectores de expresión de mamífero pTT5 que contenían la región constante de kappa humana (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14) para producir cadenas livianas quiméricas.

Ejemplo 3: Fijación y neutralización de anticuerpos anti-E-selectina.

[00396] La fijación de anticuerpos anti-E-selectina a dominios extracelulares de E-selectina humana (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 más una cola de purificación de 10 His) y de ratón (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 más una cola de purificación de 10 His) se midió mediante el uso de ELISA de fijación al antígeno recombinante con detección de HRP. Se utilizaron placas Maxisorp de 384 cavidades para capturar los polipéptidos de E-selectina recombinante etiquetados con His humanos y de ratón. Los polipéptidos se incubaron con anticuerpos quiméricos de concentraciones variables y se detectaron con anticuerpos anti-IgG1 humana etiquetados con HRP. Los anticuerpos 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 se fijaron a E-selectina humana con EC_{50} de 0,02 nM, 0,03 nM, 0,02 nM, 0,02 nM, 0,01 nM y 0,01 nM, respectivamente. Ninguno de estos anticuerpos se fijó a E-selectina de ratón, con una EC_{50} de >133 nM. El anticuerpo 0027 se fijó a la E-selectina de ratón con una EC_{50} de 0,02 nM, pero no se fijó a la E-selectina humana, con una EC_{50} de >133 nM.

[00397] La capacidad de neutralización de los anticuerpos anti-E-selectina se midió en un ensayo de competencia homogéneo AlphaLISA. Aquí, los anticuerpos compitieron contra la interacción del dominio extracelular de E-selectina humana (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 más la cola de purificación de 10 His), dominio extracelular de E-selectina de ratón (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 más la cola de purificación de 10 His) o dominio extracelular de E-selectina de *Macaca fascicularis* (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175 más la cola de purificación de 10 His) a un ligando sialil-Lewis A. Para este experimento, se agregó 1 µl de un anticuerpo a una cavidad de una placa de 384 cavidades seguido de 1 µl de

sialil Lewis A-PAA-biotina hasta una concentración final de 1,75 nM. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido de la adición de 1,4 µl de E-selectina humana, de ratón o de *Macaca fascicularis* agregada a una concentración final de 7 nM. Esto se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 15 minutos. A esto, se le agregaron 1,4 µl de microesferas AlphaLISA (donante de Ni/aceptor de SA) para una concentración de ensayo final de 10 µg/ml. Esto se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante al menos 10 horas. A continuación, se leyeron las placas mediante el uso del protocolo AlphaLISA (Envision).

[00398] Se midió la EC₅₀ de la neutralización de E-selectina humana, de ratón y de *Macaca fascicularis* para los anticuerpos quiméricos anti-E-selectina 0027, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180. Los anticuerpos 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 tuvieron valores de EC₅₀ para E-selectina humana de <1 nM, mientras que el anticuerpo 0027 no neutralizó E-selectina humana y tuvo una EC₅₀ de >133 nM. Los anticuerpos 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 tuvieron valores de EC₅₀ para E-selectina de *Macaca fascicularis* de <1 nM, el anticuerpo 0039 tuvo una EC₅₀ para E-selectina de *Macaca fascicularis* de >63 nM y el anticuerpo 0027 no neutralizó E-selectina de *Macaca fascicularis* y tuvo una EC₅₀ de >133 nM. El anticuerpo 0027 tuvo un valor de EC₅₀ de 1 nM para la E-selectina de ratón, mientras que los anticuerpos 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 no neutralizaron E-selectina de ratón y tuvieron una EC₅₀ de >133 nM (Tabla 4).

[00399] **Tabla 4.** Fijación y neutralización de anticuerpos quiméricos anti-E-selectina contra E-selectina humana, de ratón y de *Macaca fascicularis* mediante el uso de ELISA de fijación a HRP y un ensayo de neutralización AlphaLISA.

anticuerpo	HC SEQ ID NO	LC SEQ ID NO	Fijación a HRP EC ₅₀ (nM)		Neutralización alphaLISA EC ₅₀ (nM)		
			E- selectina humana	E- selectina de ratón	E-selectina humana	E- selectina de ratón	E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>
0027	124	119	>133	0,02	>133	1	>133 nM
0039	59	56	0,02	>133	<1	>133 nM	>63
0158	74	72	0,03	>133	<1	>133 nM	<1
0159	89	86	0,02	>133	<1	>133 nM	<1
0164	34	31	0,02	>133	<1	>133 nM	<1
0170	103	101	0,01	>133	<1	>133 nM	<1
0180	117	115	0,01	>133	<1	>133 nM	<1

Ejemplo 4: Evaluación cinética de anti-E-selectina mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales (SPR).

[00400] Se prepararon proteínas de dominio extracelular de E-selectina humana (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133), ratón (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135) y *Macaca fascicularis* (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175). Cada proteína contenía una etiqueta de histidina de 10 residuos del terminal C utilizada para la purificación. Se preparó un chip sensor anti-Fc humano mediante acoplamiento de amina de anticuerpo anti-IgG humana (número de catálogo BR-1008-39, GE Healthcare) a las cuatro celdas de flujo de un chip sensor recubierto de dextrano carboximetilado (CM5) (número de catálogo BR100530, GE Healthcare) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las celdas de flujo se activaron al inyectar una mezcla 1:1 de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 400 mM y N-hidroxisuccinimida (NHS) 100 mM durante 7 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/minuto. El anticuerpo anti-IgG humana se diluyó a 25 µg/ml en acetato de sodio 10 mM pH 5,0 y se inyectó en todas las celdas de flujo durante 7 minutos a 10 µl/minuto. Todas las celdas de flujo se bloquearon con etanolamina-HCl (ETH) 1M durante 7 minutos a 10 µl/minuto. El nivel de inmovilización final del anticuerpo de captura fue de aproximadamente 10.000 unidades de resonancia (RU). El amortiguador de corrida para la inmovilización y la cinética fue HBS-EP+ (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES) 10 mM, pH 7,4, cloruro de sodio 150 mM, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), 3 mM, 0,05 % (v/v) Tween-20).

[00401] Para caracterizar la fijación de anticuerpos a E-selectina humana, de *Macaca fascicularis* y de ratón, se diluyó un anticuerpo a 0,5 µg/ml en HBS-EP+ y se capturó mediante anti-IgG humana inmovilizada en las celdas de flujo 2, 3 y 4 durante 30 segundos a 1 minuto a una velocidad de flujo de 10 µl/minuto para lograr un nivel de captura de 70 a 300 RU. La celda de flujo 1 se usó como superficie de referencia. Después de la captura de anticuerpo, la velocidad de flujo se incrementó a 50 µl/minuto y se inyectaron amortiguador o proteínas de E-selectina con una concentración de 15 nM a 405 nM en HBS-EP+ en todas las celdas de flujo durante un período de asociación de 1,0 minuto y luego se dejaron disociar durante 6 a 15 minutos. Los ciclos de amortiguador HBS-EP+ recolectados para cada anticuerpo capturado se utilizaron para una doble referencia (Myszka DG. J. Mol. Recognition 1999; 12(5):279-84). Al final de cada ciclo, toda la superficie anti-IgG se regeneró mediante un pulso de 30 segundos de MgCl₂ 3 M y un pulso de 30 segundos de amortiguador iónico (MgCl₂ 1,83 M, urea 0,92 M, HCl de guanidina 1,83 M, pH 7,4) (Andersson K. Anal. Chem. 1999; 71(13): 2475-81). Los ensayos cinéticos se realizaron a 25 °C a una velocidad de recolección de 10 Hertz (Hz) en un instrumento

BIAcore™ T200 (GE Healthcare). Las constantes de velocidad y las afinidades se determinaron al ajustar los datos a un modelo de fijación 1:1 en el software BIAcore™ T200 Evaluation versión 3.0 (GE Healthcare).

[00402] Se determinaron las afinidades de fijación para E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* para los anticuerpos 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 y para el anticuerpo contra E-selectina de ratón 0027 al fijar primero el anticuerpo a anti-IgG humana inmovilizada. Después de la captura de anticuerpo, las diluciones de las proteínas de E-selectina fluyeron y se determinaron los valores de la constante de velocidad de asociación (k_a), la constante de velocidad de disociación (k_d), $t_{1/2}$ y K_D respecto de la fijación a E-selectina humana, de *Macaca fascicularis* y de ratón (Tablas 5-7). En este análisis de SPR, la afinidad (K_D) de los anticuerpos 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 a la E-selectina humana fue de 68,0 nM, 21,6 nM, 324 nM, 54,4 nM, 628 nM y 2940 nM, respectivamente. La afinidad K_D de los anticuerpos quiméricos 0039, 0159, 0164, 0170 y 0180 a la E-selectina de *Macaca fascicularis* fue de 45,8 nM, 243,5 nM, 45,4 nM, 492 nM y 3145 nM, respectivamente. El anticuerpo 0158 no mostró fijación a la E-selectina de *Macaca fascicularis*. La afinidad K_D del anticuerpo quimérico 0027 a la E-selectina de ratón fue de 1,2 nM.

[00403] **Tabla 5.** Afinidad de anticuerpos anti-E-selectina contra E-selectina humana medida por resonancia de plasmones superficiales.

anticuerpo	HC SEQ ID NO	LC SEQ ID NO	analito			
			E-selectina humana			
			k_a	k_d	$t_{1/2}$	K_D
			(1/Ms)	(1/s)	(s)	(nM)
0039	59	56	6,42E+04	4,21E-03	173,64	68,0
0158	74	72	8,10E+04	1,75E-03	397,16	21,6
0159	89	86	1,15E+05	3,71E-02	18,71	324
0164	34	31	2,07E+05	1,13E-02	61,61	54,4
0170	103	101	8,74E+04	5,49E-02	12,64	628,5
0180	117	115	2,62E+05	6,66E-01	1,05	2940

[00404] **Tabla 6.** Afinidad de anticuerpos anti-E-selectina contra E-selectina de *Macaca fascicularis* medida por resonancia de plasmones superficiales.

anticuerpo	HC SEQ ID NO	LC SEQ ID NO	analito			
			E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>			
			k_a	k_d	$t_{1/2}$	K_D
			(1/Ms)	(1/s)	(s)	(nM)
0039	59	56	8,24E+04	3,77E-03	184,07	45,8
0158	74	72	ND	ND		débil
0159	89	86	1,54E+05	3,74E-02	18,53	243,5
0164	34	31	2,65E+05	1,20E-02	57,75	45,4

0170	103	101	1,15E+05	5,64E-02	12,30	492
0180	117	115	2,45E+05	7,49E-01	0,93	3145

ND: No detectado

[00405] **Tabla 7.** Afinidad del anticuerpo anti-E-selectina de ratón contra E-selectina de ratón medida por resonancia de plasmones superficiales.

anticuerpo	HC SEQ ID NO	LC SEQ ID NO	analito			
			E-selectina de ratón			
			ka	kd	t _{1/2}	K _D
			(1/Ms)	(1/s)	(s)	(nM)
0027	124	119	1,92E+05	2,31E-04	3010,95	1,2

Ejemplo 5: Neutralización de fijación al ligando de anticuerpos anti-E-selectina en un ensayo de fijación estática.

[00406] La capacidad de los anticuerpos anti-E-selectina para neutralizar la fijación al ligando se evaluó en un ensayo de neutralización estática mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) competitivo para evaluar la neutralización del antígeno sialil Lewis a las células de ovario de hámster chino (CHO) diseñadas por ingeniería genética para expresar E-selectina.

[00407] Brevemente, las células CHO que expresan E-selectina humana se cultivaron en medio de cultivo (MEM (Medio Esencial Mínimo) Alpha Medium, complementado con 10 % de suero bovino fetal dializado, metotrexato 100 nM y 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) y se sembraron a 12.500 células por cavidad en una placa de cultivo tisular de 96 cavidades y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas para formar una monocapa confluyente. Las placas se lavaron posteriormente dos veces con 200 µl de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio. Los anticuerpos anti-E-selectina 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 o un control de isotipo IgG1 se agregaron al ensayo en presencia de un pequeño conjugado sintético de poliacrilamida de sialil Lewis A biotinilada (Carbosynth LLC; OS45446) con estreptavidina/peroxidasa de rábano picante (100 µl en total) y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 2 horas. Las placas se lavaron luego dos veces con 200 µl de PBS libre de calcio y magnesio. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con 200 µl de amortiguador de lavado que contenía cloruro de calcio 2 mM (TRIS [trisaminometano] 50 mM, cloruro de sodio 150 mM; 0,05 % polisorbato 20, pH 7,4; cloruro de calcio 2 mM). La señal se desarrolló al agregar 100 µl de sustrato Ultra TMB de 1 etapa (Thermo Scientific, 34028) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las

reacciones se detuvieron mediante el uso de ácido sulfúrico 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm (Spectramax M5e). Los datos se analizaron y se graficaron mediante el software GraphPad Prism (Versión 8.0.2). Los valores de concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) estimados derivaron del análisis (Tabla 8).

[00408] Los anticuerpos evaluados neutralizaron de manera dependiente de la dosis la fijación del ligando neutralizado a E-selectina humana expresada en la superficie celular. Los valores de IC₅₀ estimados en el ensayo de neutralización para los anticuerpos quiméricos 0039, 0164, 0158, 0159, 0170 y 0180 fueron 3,76 nM, 2,77 nM, 2,87 nM, 3,24 nM, 2,3 nM y 3,83 nM, respectivamente. El anticuerpo 0027 no neutralizó la fijación del ligando de poliacrilamida sialil Lewis A a E-selectina humana expresada en la superficie celular. Un anticuerpo de control de IgG humana no demostró efecto en estos ensayos.

Ejemplo 6: Inhibición de la fijación celular en un ensayo de adhesión estática de anticuerpos anti-E-selectina.

[00409] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos quiméricos anti-E-selectina 0039, 0164, 0158, 0159, 0170 y 0180 para inhibir la adhesión de células que expresan un ligando de E-selectina, en una condición estática, a células CHO que expresan E-selectina humana.

[00410] Las células CHO que expresan E-selectina humana se cultivaron en medio Alpha (MEM [medio esencial mínimo] Alpha Medium, Corning)/10 % de suero bovino fetal dializado (GIBCO)/100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco)/metotrexato 100 nM y se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Las células HL-60 (una línea celular promielocítica humana que expresa el ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil Lewis) se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad en medio de crecimiento de glutamina/RPMI (Gibco)/10 % de suero bovino fetal (Gibco)/100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco). Las células CHO que expresan E-selectina humana se sembraron en placas negras de fondo plano de 96 cavidades a una densidad de 11.500 células/cavidad y se incubaron para formar una monocapa confluyente durante 48 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora humidificada.

[00411] Para el ensayo de neutralización de adhesión estática, las células HL-60 en fase logarítmica se lavaron tres veces en PBS y se resuspendieron en 500 µl de PBS y un volumen igual de colorante fluorescente de éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína 2 µM [(CFSE) (ThermoFisher)]. Las células se incubaron

durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El etiquetado se detuvo con la adición de 4 ml de medio de crecimiento de HL-60 frío en hielo durante 5 minutos. Las células HL-60 etiquetadas se lavaron tres veces en solución salina balanceada de Hanks (HBSS)/1 % de albúmina de suero bovino (BSA)/0,1 % de azida de sodio y se volvieron a suspender a una densidad de 400.000 células/ml para su uso en los ensayos de adhesión estática.

[00412] Los anticuerpos quiméricos anti-E-selectina 0039, 0164, 0158, 0159, 0154, 0170 y 0180, los anticuerpos anti-P-selectina de control negativo y una IgG humana de control se diluyeron en serie (concentraciones que variaron de 1333 nM a 1,83 nM) en HBSS/1 % de BSA/0,1 % de azida de sodio. Se preparó un control sin anticuerpos para cada anticuerpo. La monocapa de células CHO de E-selectina se lavó suavemente tres veces con HBSS/1 % de BSA/0,1 % de azida de sodio y se agregaron 100 µl de la suspensión celular a las cavidades y se incubaron durante una hora en hielo. Se agregaron cincuenta µl (20.000) de células HL-60 etiquetadas con CFSE por cavidad sin eliminar el anticuerpo. Las células HL-60 etiquetadas se incubaron con la monocapa de células CHO durante 1 hora a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora humidificada. La placa se lavó tres veces con HBSS/1 % de BSA/0,1 % de azida de sodio, se agregaron 100 µl de HBSS/1 % de Triton-X100 y se incubó durante 10 minutos en la oscuridad. La fluorescencia de las células HL-60 fijadas se midió a longitudes de onda de excitación/emisión de 494/521 nanómetros mediante el uso de Spectramax i3X (Molecular Devices) para determinar la cantidad de células HL-60 adheridas. Se restó la fijación de fondo mediante el uso de la señal de las cavidades de control sin células y se determinó el % de adhesión mediante el uso del control de IgG humana como 100 %. Los valores estimados de EC₅₀ se determinaron en la *suite* GraphPad Prism.

[00413] En condiciones de adhesión estática, los anticuerpos 0158 y 0164 inhibieron la adhesión de las células HL-60 a las células CHO que expresan E-selectina humana con >50 % de inhibición a 16,5 nM. El anticuerpo 0159 inhibió la adhesión de las células HL-60 a las células CHO que expresan E-selectina humana con >50 % de inhibición a 49,4 nM. Los anticuerpos 0170 y 0180 inhibieron la adhesión de HL-60 a células CHO que expresan E-selectina humana con >50 % de inhibición a 444 nM. El anticuerpo 0039 a una concentración de hasta 1333 nM no inhibió la adhesión de las células HL-60 a las células CHO que expresan E-selectina humana. Los anticuerpos de control negativo no inhibieron la adhesión de las células HL-60 (Tabla 8).

Ejemplo 7: Fijación a la superficie celular (FACS) de los anticuerpos anti-E-selectina.

[00414] La fijación de los anticuerpos se evaluó mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células diseñadas por ingeniería genética para expresar E-selectina o P-selectina. También se evaluó la reactividad cruzada de las especies con el *Macaca fascicularis*.

[00415] Las células CHO que expresan E-selectina o P-selectina humana se cultivaron en medio Alpha (MEM [medio esencial mínimo] Alpha Medium, Corning) complementado con 10 % de suero bovino fetal dializado (GIBCO), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco). Para las células CHO que expresan E-selectina humana, el medio de crecimiento también se complementó con metotrexato 100 nM. Las células CHO que expresan E-selectina de *Macaca fascicularis* se cultivaron en medio R1 (medio de Eagle modificado por Dulbecco RI/modificación F12 de Ham) complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (GIBCO), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y 125 µg/ml de zeocina (GIBCO). Las células se mantuvieron en medio de crecimiento a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora humidificada. El metotrexato o la zeocina se eliminaron del medio antes del cultivo para los experimentos. Las células CHO de E-selectina o las células de P-selectina se separaron de los matraces T-150 mediante el uso de solución salina cítrica (KCl 135 mM, citrato de sodio 15 mM) y se recalcificaron inmediatamente con la adición de CaCl₂ a las células desprendidas hasta una concentración final de 1 mM. El medio de crecimiento se agregó inmediatamente a las células separadas, luego se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para peletizar las células. Las células se colocaron en placas con fondo en forma de V de 96 cavidades en amortiguador de CHO frío que consistía en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), pH 7,4 que contenía albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 %, cloruro de calcio a una concentración final de 1 mM y azida de sodio a una concentración final de 0,1 % durante 5 minutos en hielo húmedo. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 300 x g durante 2 minutos a 4 °C para eliminar el amortiguador.

[00416] Se prepararon soluciones de anticuerpos de prueba con diluciones en serie (que variaron de 1333,3 nM a 0,0022 nM) mediante el uso de amortiguador de CHO como diluyente y se agregaron 100 µl y se incubaron en el volumen designado de anticuerpo diluido en serie y se incubaron durante 45 minutos en hielo. Después de

la incubación, se eliminaron los anticuerpos y las células se lavaron tres veces mediante centrifugación a 300 x g durante 1 minuto a 4 °C y se volvieron a suspender en amortiguador de CHO frío. Las células lavadas se incubaron durante 30 minutos en hielo húmedo con 100 µl de una dilución 1:1000 de anti-IgG humana en cabra del fragmento AffiniPure F(ab')₂ conjugado con APC, Fcy (Jackson Immunoresearch). Las células se lavaron tres o cuatro veces antes de la resuspensión en amortiguador de CHO para análisis de citometría de flujo. Se utilizó un instrumento Becton Dickinson LSRFortessa que utiliza una línea láser de 640 nanómetros para adquirir datos de fluorescencia celular. La media geométrica de fluorescencia de las células se analizó mediante el paquete de software FlowJo (FlowJo, LLC) y se representó frente a la concentración de anticuerpo. Los valores estimados de EC₅₀ se calcularon mediante el uso de un análisis de regresión no lineal en la *suite* Prism (GraphPad, versión 8) (Tabla 8).

[00417] Los anticuerpos quiméricos 0039, 0164, 0158, 0159, 0154, 0170 y 0180 exhibieron fijación a E-selectina humana expresada en la superficie celular en células CHO con valores estimados de EC₅₀ que variaban de 1,99 nM a 4,99 nM (Tabla 8). Los anticuerpos 0039, 0164, 0158, 0159, 0170 y 0180 también se fijaron a células CHO que expresan E-selectina de *Macaca fascicularis* con valores de EC₅₀ estimados que variaban de 3,37 a 13,98. Los anticuerpos 0164, 0158, 0159, 0154, 0170 y 0180 no se fijaron a la P-selectina humana expresada en CHO, lo que indica selectividad por E-selectina. El anticuerpo 0039 exhibió una fijación mínima a la P-selectina humana expresada en CHO con un valor de EC₅₀ estimado >354 nM.

[00418] **Tabla 8.** Fijación celular y neutralización de anticuerpos anti-E-selectina.

anticuerpo	neutralización estática		fijación de anticuerpo a la superficie celular por FACS		
	células CHO de E-selectina humana de adhesión al ligando sialil Lewis IC ₅₀ (nM)	Células CHO de E-selectina humana de adhesión celular HL-60 IC ₅₀ (nM)	fijación a células CHO de E-selectina humana EC ₅₀ (nM)	fijación a células CHO de E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> EC ₅₀ (nM)	fijación a células CHO de P-selectina humana EC ₅₀ (nM)
0039	3,76	ND	4,99	4,07	>354 nM
0164	2,77	>50 % a 16,5 nM	4,43	1,73	ND
0158	2,87	>50 % a 16,5 nM	3,75	13,98	ND
0159	3,24	>50 % a 49,4 nM	2,44	3,37	ND
0170	2,30	>50 % a 444 nM	1,99	3,76	ND
0180	3,83	>50 % a 444 nM	4,31	3,66	ND
ND = No detectado					

Ejemplo 8: Neutralización *ex vivo* de anticuerpos anti-E-selectina mediante un ensayo de flujo fisiológico

[00419] La adhesión celular *ex vivo* se analizó en condiciones de flujo fisiológico mediante el uso de un sistema BioFlux™ (Fluxion, San Francisco, CA, EE. UU.) mediante el uso de placas/cámaras BioFlux™ (Fluxion Biosciences, 48 cavidades de bajo cizallamiento, 0-20 dinas/cm²; 910-0004). Los ensayos de adhesión se realizaron mediante el uso de proteínas de E-selectina o P-selectina solubles purificadas recombinantes y células HL-60 humanas (ATCC CCL-240). Las células HL-60 expresan el ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil Lewis. Las células HL-60 se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad en medio de crecimiento RPMI/glutamina (Gibco) con 10 % de suero bovino fetal (Gibco); 1X penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se mantuvieron a 37 °C antes de la perfusión y los ensayos BioFlux™ se realizaron a temperatura ambiente. Primero, para imitar una superficie de una célula endotelial activada, las cámaras de flujo se recubrieron con cantidades iguales de proteínas recombinantes solubles de E-selectina y P-selectina humana. Los microcanales de flujo BioFlux™ se recubrieron con 10 µg/ml cada uno de P-selectina (R & D Systems, ADP3) y E-selectina (R & D Systems, ADP1) humana recombinante soluble preparada en PBS, se perfundieron a 1 dina/cm² durante 5 minutos, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron con PBS durante 3-5 minutos a 1 dina/cm². Los anticuerpos quiméricos contra E-selectina, 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 se diluyeron en PBS y las placas se trataron con los artículos de prueba (concentraciones de 1,6 a 1000 nM) o el control del vehículo durante 1 hora a 1 dina/cm². Las células HL-60 se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se tiñeron con Calcein AM (Calcein; Life Technologies™; C3099) durante 30 minutos, se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS; Gibco) y se volvieron a suspender hasta una concentración de 3 x 10⁶ células/ml en PBS. También se agregaron reservas de anticuerpos diluidos a la suspensión celular antes de la perfusión en las cámaras de flujo. Se perfundió una alícuota de 100 µl de células HL-60 en cada canal durante 10 minutos a un flujo de cizallamiento fisiológico de 1 dina/cm². La PBS se perfundió durante 2-3 minutos a 1 dina/cm² para eliminar las células no adherentes. Las células adherentes se visualizaron y contaron mediante el uso de un microscopio fluorescente de contraste de fase de fase invertida Nikon Eclipse Ti-S (NIS-Elements BR 3.2 de 64 bits) con aumento de 40X. Los recuentos celulares se normalizaron al control de vehículo de

amortiguador de fosfato. Cada experimento tiene dos cavidades por condición. Los datos se graficaron y analizaron mediante el uso de GraphPad Prism (8.0.2). Los valores de concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) estimados derivaron del análisis.

[00420] En estos estudios, que fueron diseñados para imitar el flujo sanguíneo a través de la vasculatura *ex vivo*, los anticuerpos contra E-selectina 0039, 0164, 0158, 0159, 0170 y 0180 neutralizaron la adhesión de las células HL-60 a la proteína de E-selectina recombinante soluble con valores estimados de IC_{50} de 264,7 nM, 1,7 nM, 17,9 nM, 21 nM, 74,2 nM y 224,7 nM, respectivamente (Tabla 9).

[00421] **Tabla 9.** Neutralización de la fijación de HL-60 a la proteína de E-selectina humana soluble en flujo fisiológico.

anticuerpo	neutralización de la fijación de células HL-60 en flujo fisiológico a proteína de E-selectina humana soluble IC_{50} (nM)
0039	264,7
0164	1,7
0158	17,9
0159	21
0170	74,2
0180	224,7

Ejemplo 9: Agrupación de epítomos de anticuerpos anti-E-selectina

[00422] Los seis anticuerpos quiméricos neutralizantes (0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180) se agruparon en categorías de epítomos que se basan en un ensayo de competencia mediante el uso de un biosensor Octet. Las puntas recubiertas con anti-FC humano (AHC) se transfirieron a una cavidad que contenía 20 μ g/ml de uno de los siete anticuerpos durante 600 segundos para permitir que el primer anticuerpo se fijara al FC anti-humano. Las puntas se transfirieron a una segunda cavidad con dominio extracelular de E-selectina humana 300 nM (SEQ ID NO: 133 más una cola de purificación de 10 His) y se dejaron asociar durante 100 segundos. Finalmente, las puntas se transfirieron a una tercera cavidad que contenía un segundo anticuerpo durante 100 segundos. Los anticuerpos se clasificaron como no competidores si el segundo anticuerpo mostraba un aumento en la señal del biosensor por encima de la producida por el primer anticuerpo, y se clasificaron como competidores si el segundo anticuerpo no producía un aumento adicional en la señal (Tabla 10).

[00423] En función de estos datos de competencia, los anticuerpos 0159, 0164, 0170 y 0180 definieron un grupo de epítomos, 0158 definió un segundo grupo de epítomos y 0039 definió un tercer grupo de epítomos. El primer grupo y el segundo

grupo se superponen parcialmente, el segundo y el tercer grupo se superponen parcialmente y el primer y el tercer grupo no se superponen. En la Tabla 10, un "+" indica que el segundo anticuerpo (indicado por el encabezado de la columna) se fijó en presencia del primer anticuerpo (indicado por los encabezados de las filas). Un "-" indica que no se observó ningún aumento en la señal tras la adición del segundo anticuerpo.

[00424] **Tabla 10.** Agrupación de epítomos de anticuerpos anti-IL-E-selectina por biosensor de octeto

1.° Ab (filas)	0039	0158	0159	0164	0170	0180
2.° Ab (columna)						
0039	-	-	+	+	+	+
0158	-	-	-	-	-	-
0159	+	-	-	-	-	-
0164	+	-	-	-	-	-
0170	+	-	-	-	-	-
0180	+	-	-	-	-	-

Ejemplo 10: Epítipo y estructura cristalina

[00425] El fragmento Fab del anticuerpo quimérico anti-E-selectina 0164 se obtuvo al escindir la IgG de longitud completa con papaína y eliminar el Fc mediante el uso de una resina de Proteína A. El Fab se mezcló con E-selectina humana troncada (descrita en el Ejemplo 1) en una relación molar de 1:1 y el complejo resultante se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los cristales del complejo se formaron en acetato de calcio 200 mM, pH 7,5, 20 % de PEG 3350. Los datos se recopilaron a 2,68 Å en la línea de haz 17-ID en Advanced Photon Source. La estructura se resolvió mediante sustitución molecular y se refinó a R/R libre de 0,243/0,252 (**Figura 1**). La estructura de cristal tiene una única copia de E-selectina fijada a un único fragmento Fab 0164 en la unidad asimétrica en el grupo espacial P3121.

[00426] En función de la estructura de cristal, los residuos de E-selectina que interactuaron con el anticuerpo 0164 se determinaron en función de: i) residuos que estaban dentro de 3,8 Å, ii) área superficial normalizada (Å²) enterrada debido a interacciones entre pares de residuos del anticuerpo 0164 y residuos de E-selectina de >5Å², iii) formación de un puente salino, iv) formación de un enlace de hidrógeno o v) formación de un enlace de hidrógeno mediado por agua. La lista de residuos, cuya numeración se basa en la secuencia de E-selectina humana madura (SEQ ID NO:

132), incluye T7, E8, A9, M10, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, N105, E107, R108, S110, K111, K112 y K113 (Tabla 11).

[00427] La interacción de E-selectina con su ligando natural sialil-Lewis X (sLeX) mediante cristalografía de rayos X se muestra en la estructura PDB (1g1t) (ver www.rcsb.org/structure/1g1t). En esta estructura, los residuos de E-selectina que están dentro de 3,8 Å de sLeX y son similares a la interacción con el anticuerpo 0164 son Y48, N82, N83, E92, Y94, R97, N105 y E107 en función de la numeración de SEQ ID NO: 132. Los residuos adicionales que también están dentro de 3,8 ángstroms de sLex son E80, E98 y D106 (en función de la numeración de SEQ ID NO: 132). Dada la superposición significativa de los epítomos de sLex y el anticuerpo 0164, es probable que la actividad de neutralización demostrada por este anticuerpo sea el resultado del bloqueo directo de la interacción de sLeX y otros ligandos similares como sialil-Lewis A (sLeA) con E-selectina.

[00428] **Tabla 11.** Interacción de E-selectina con anticuerpo anti-E-selectina 0164 o sLeX.

Posición de la E-selectina	amino-ácido	Interacción con el anticuerpo 0164					Interacción con sLeX dentro de 3,8 Å
		dentro de 3,8 Å	área de superficie enterrada (Å ²)	enlace de hidrógeno	punto salino	Interacción mediada por H ₂ O	
7	T	X	13,3				
8	E	X	94,5	1			
9	A	X	39,2				
10	M		5				
11	T	X	7,3				
46	P	X	56,2				
47	S	X	36,1	1			
48	Y	X	13,1				X
82	N	X	29,5	1			X
83	N	X	29,4	1			X
85	Q	X	35,7				
88	E		9,9	1			
92	E	X	6,9	1			X
94	Y	X	9,3	1			X
97	R		29,7			X	X
105	N	X	1,4	1			X
107	E	X	30,6	1			X
108	R	X	72,6	2			
110	S	X	29,3	1			
111	K	X	63,9		X		
112	K	X	112,6	1	X	X	
113	K		15,1				
80	E						X
98	E						X
106	D						X

Ejemplo 11: Humanización de anticuerpos anti-E-selectina de rata

[00429] Se generaron versiones humanizadas de los anticuerpos quiméricos de rata neutralizantes 0039, 0158, 0159, 0164, 0170 y 0180 mediante injerto de región determinante de la complementariedad (CDR) (denominado en lo sucesivo "injertado con CDR"). Para los anticuerpos 0039, 0158, 0164 y 0180, se injertaron CDR de la cadena pesada en una región marco de DP-54 humano (subgrupo VH3). El anticuerpo humanizado 0039 contenía residuos de aminoácidos de rata que incluían metionina en la posición 48, glicina en la posición 49 y valina en la posición 78. El anticuerpo humanizado 0158 contenía residuos de aminoácidos de rata que incluían valina en la posición 24, metionina en la posición 48, glicina en la posición 49, treonina en la posición 73 y valina en la posición 78. El anticuerpo humanizado 0164 contenía residuos de aminoácidos de rata que incluían alanina en la posición 71, alanina en la posición 78 y metionina en la posición 94. El anticuerpo humanizado 0180 contenía residuos de aminoácidos de rata que incluían isoleucina en la posición 48, glicina en la posición 49, leucina en la posición 69, serina en la posición 71 treonina en la posición 73, alanina en la posición 78 e isoleucina en la posición 94.

[00430] Para el anticuerpo 0159, se injertaron CDR de la cadena pesada en la región marco de DP-7 (subgrupo VH1). El anticuerpo humanizado 0159 contenía residuos de aminoácidos de rata que incluían valina en la posición 24, leucina en la posición 69, alanina en la posición 78 y metionina en la posición 94.

[00431] Para el anticuerpo 0170, las CDR de la cadena pesada se injertaron en la región marco de DP-10 (subgrupo VH1). El anticuerpo humanizado 0170 contenía residuos de aminoácidos de rata que incluían valina en la posición 24, isoleucina en la posición 69, treonina en la posición 73 y valina en la posición 94.

[00432] Los 6 anticuerpos humanizados se injertaron con el segmento J de JH4 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6).

[00433] Para los anticuerpos 0039, 0158, 0164, 0170 y 0180, se injertaron CDR de la cadena liviana en la región marco de DPK9 humano (subgrupo VKI). El anticuerpo humanizado 0039 contenía un residuo de aminoácido de rata de cisteína en L87. El anticuerpo humanizado 0158 contenía un residuo de aminoácido de rata de metionina en la posición 4. Los anticuerpos humanizados 0164 y 180 contenían un residuo de aminoácido de rata de fenilalanina en la posición 87. El anticuerpo humanizado 0170 contenía residuos de aminoácidos de rata que incluían metionina en la posición 48 y fenilalanina en la posición 87.

[00434] Para el anticuerpo 0159, las CDR de la cadena liviana se injertaron en

la región marco de DPK1 humano (subgrupo VKI).

[00435] Las regiones V_H humanizadas se unieron a la región constante de IgG1 humana mutada con función efectora (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16) y luego se subclonaron en un vector de expresión patentado para generar las cadenas pesadas injertadas con CDR SEQ ID NO: 51 (injerto de CDR 0039; cadena pesada del anticuerpo 0525), SEQ ID NO: 62 (injerto de CDR 0158; cadena pesada del anticuerpo 265_254), SEQ ID NO: 76 (injerto de CDR 0159; cadena pesada del anticuerpo 0929_0548), SEQ ID NO: 22 (injerto de CDR 0164; cadena pesada del anticuerpo 0841), SEQ ID NO: 91 (injerto de CDR 0170; cadena pesada del anticuerpo 0955_0300) y SEQ ID NO: 110 (injerto de CDR 0180; cadena pesada del anticuerpo 0564).

[00436] Las regiones V_L humanizadas se fusionaron con la región constante kappa humana (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14) y luego se subclonaron en un vector de expresión patentado para crear las cadenas livianas injertadas con CDR SEQ ID NO: 46 (injerto de CDR 0039; cadena liviana del anticuerpo 0525), SEQ ID NO: 67 (injerto de CDR 0158; cadena liviana del anticuerpo 0265_0254), SEQ ID NO: 81 (injerto de CDR 0159; cadena liviana del anticuerpo 0929_0548), SEQ ID NO: 17 (injerto de CDR 0164; cadena liviana del anticuerpo 0841), SEQ ID NO: 96 (injerto de CDR 0170; cadena liviana del anticuerpo 0955_0300) y SEQ ID NO: 105 (injerto de CDR 0180; cadena liviana del anticuerpo 0564).

[00437] **Tabla 12.** Anticuerpos anti-E-selectina.

Anticuerpo quimérico	Anticuerpo humanizado	Anticuerpo optimizado
0164	0841	
	0978	1444 1448 1282 1284
0039	0525	
0158	0265_0254	
0159	0929_0548	
0170	0955_0300	
0180	0564	
0027		

Ejemplo 12: Evaluación cinética de anti-E-selectina humanizado mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales.

[00438] Se determinó la afinidad de fijación a E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* para el anticuerpo humanizado 0841 (HC SEQ ID NO: 22, LC SEQ ID NO:

17) mediante el uso de SPR en un método similar al método descrito en el Ejemplo 4. Esto se hizo al fijar primero el anticuerpo a anti-IgG humano inmovilizado. Después de la captura de anticuerpo, las diluciones de las proteínas de E-selectina fluyeron y se determinaron los valores de la constante de velocidad de asociación (k_a), la constante de velocidad de disociación (k_d), $t_{1/2}$ y K_D respecto de la fijación a E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* (Tabla 13). En este análisis de SPR, la afinidad del anticuerpo 0841 anti-E-selectina humanizado a E-selectina humana y E-selectina de *Macaca fascicularis* fue de 92,85 nM y 138,5 nM, respectivamente.

[00439] **Tabla 13.** Afinidad de anticuerpos anti-E-selectina a E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* medida por resonancia de plasmones superficiales.

anticuerpo	analito							
	E-selectina humana				E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>			
	K_a	k_d	$t_{1/2}$	K_D	k_a	k_d	$t_{1/2}$	K_D
	(1/Ms)	(1/s)	(s)	(nM)	(1/Ms)	(1/s)	(s)	(nM)
0841	2,55E+05	2,37E-02	29,31	92,85	1,82E+05	2,52E-02	27,56	138,5

Ejemplo 13: Fijación a la superficie celular (FACS) del anticuerpo anti-E-selectina humanizado (0841)

[00440] La fijación del anticuerpo se evaluó mediante el uso de citometría de flujo (FACS) a células diseñadas por ingeniería genética para expresar E-selectina. También se evaluó la reactividad cruzada de las especies con el *Macaca fascicularis*.

[00441] Las células CHO que expresan E-selectina humana se cultivaron en medio Alpha (MEM [medio esencial mínimo]) Alpha Medium, Corning) completando con 10 % de suero bovino fetal dializado (GIBCO), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin en el medio de cultivo (Gibco). Para las células CHO que expresan E-selectina humana, el medio de crecimiento también se complementó con metotrexato 100 nM. Las células CHO que expresan E-selectina de *Macaca fascicularis* se cultivaron en medio R1 (medio de Eagle modificado por Dulbecco RI/modificación F12 de Ham) complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (GIBCO), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin y 125 µg/ml de zeocina (GIBCO). Las células se mantuvieron en medio de crecimiento a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora humidificada. El metotrexato o la zeocina se eliminaron del medio antes del cultivo para los experimentos. Las células CHO de E-selectina se separaron de los matraces T-150 mediante el uso de solución salina cítrica (KCl 135 mM, citrato de sodio 15 mM) y se recalcificaron inmediatamente con la adición de CaCl₂ a las células desprendidas

hasta una concentración final de 1 mM. El medio de crecimiento se agregó inmediatamente a las células separadas, luego se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para peletizar las células. Las células se colocaron en placas de fondo redondo de 96 cavidades en amortiguador de CHO frío que consistía en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), pH 7,4 que contenía albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 %, cloruro de calcio a una concentración final de 1 mM y azida de sodio a una concentración final de 0,1 % durante 5 minutos en hielo húmedo. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 300 x g durante 2 minutos a 4 °C para eliminar el amortiguador.

[00442] Se prepararon soluciones de anticuerpos de prueba con diluciones en serie (que variaron de 1333,3 nM a 0,0022 nM) mediante el uso de amortiguador de CHO como diluyente y se agregaron 100 µl en el volumen designado de anticuerpo diluido en serie y se incubaron durante 45 minutos en hielo. Después de la incubación, se eliminaron los anticuerpos y las células se lavaron tres veces mediante centrifugación a 300 x g durante 1 minuto a 4 °C y se volvieron a suspender en amortiguador de CHO frío. Las células lavadas se volvieron a suspender y se incubaron durante 30 minutos en hielo húmedo con 100 µl de una dilución 1:1000 de anti-IgG humana en cabra del fragmento AffiniPure F(ab')₂ conjugado con APC, Fcγ (Jackson ImmunoResearch). Las células se lavaron tres o cuatro veces antes de la resuspensión en amortiguador de CHO para análisis de citometría de flujo. Se utilizó un instrumento Becton Dickinson LSRFortessa que utiliza una línea láser de 640 nanómetros para adquirir datos de fluorescencia celular. La media geométrica de fluorescencia de las células se analizó mediante el paquete de software FlowJo (FlowJo, LLC) y se representó frente a la concentración de anticuerpo. Los valores estimados de EC₅₀ se calcularon mediante el uso de un análisis de regresión no lineal en la *suite* Prism GraphPad.

[00443] La fijación del anticuerpo humanizado 0841 a la E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie de las células CHO fue similar con valores de EC₅₀ estimados de 1,62 y 1,54 nM, respectivamente (Tabla 14). Los valores de EC₅₀ estimados para el anticuerpo 0164 en el mismo ensayo fueron similares con valores de EC₅₀ estimados de 1,39 y 1,73 nM para la E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* expresada en CHO, respectivamente (Tabla 14).

Ejemplo 14: Neutralización del anticuerpo anti-E-selectina humanizado de la fijación del ligando a células CHO que expresan E-selectina humana o de *Macaca fascicularis*

[00444] En un ensayo de adhesión celular de ligando estático, el ligando de E-selectina conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y los anticuerpos contra E-selectina compiten por la fijación a E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* expresada en células de ovario de hámster chino (CHO). La capacidad de los anticuerpos anti-E-selectina para neutralizar la fijación al ligando se evaluó en un ensayo de neutralización estática mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) competitivo para evaluar la neutralización del antígeno sialil Lewis a las células de ovario de hámster chino (CHO) diseñadas por ingeniería genética para expresar E-selectina humana o de *Macaca fascicularis*.

[00445] Las células CHO que expresan E-selectina humana se cultivaron en medio de cultivo (MEM (medio esencial mínimo) Alpha Medium, complementado con 10 % de suero bovino fetal dializado, metotrexato 100 nM y 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) y las células CHO que expresan E-selectina de *Macaca fascicularis* se cultivaron en medio R1 (medio de Eagle modificado por Dulbecco R1/modificación F12 de Ham) complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (GIBCO), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 125 µg/ml de zeocina (GIBCO). Las células CHO que expresan E-selectina se sembraron a 12.500 células por cavidad en una placa de cultivo tisular de 96 cavidades y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas para formar una monocapa confluyente. Las placas se lavaron posteriormente dos veces con 200 µl de PBS libre de calcio y magnesio. Los anticuerpos anti-E-selectina, o un control de isotipo IgG1, se agregaron al ensayo en presencia de un pequeño conjugado sintético de poliacrilamida sialil-Lewis A biotinilado (Carbosynth LLC, OS45446) o poliacrilamida sialil-Lewis X (Glycotech, 01-045) con una estreptavidina/peroxidasa de rábano picante (100 µl en total) y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 2 horas. Las placas se lavaron luego dos veces con 200 µl de PBS libre de calcio y magnesio. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con 200 µl de amortiguador de lavado que contenía cloruro de calcio 2 mM (TRIS [trisaminometano] 50 mM, cloruro de sodio 150 mM; 0,05 % polisorbato 20, pH 7,4; cloruro de calcio 2 mM). La señal se desarrolló al agregar 100 µl de sustrato Ultra TMB de 1 etapa (Thermo Scientific, 34028) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron mediante el uso de ácido sulfúrico 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm (Spectramax M5e). Los datos se analizaron y se graficaron mediante el software GraphPad Prism (Versión 8.0.2). Los valores de concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) estimados derivaron del análisis.

[00446] La neutralización de la fijación del ligando sialil Lewis mediante el anticuerpo humanizado 0841 a la E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* expresada en la superficie de las células CHO fue similar con valores de IC₅₀ estimados de 3,81 y 1,74 nM, respectivamente (Tabla 14). Los valores de IC₅₀ estimados para 0164 en el mismo ensayo fueron similares con valores de IC₅₀ estimados de 5,17 y 2,00 nM para la selectina E-humana y de *Macaca fascicularis* expresada en CHO, respectivamente.

Ejemplo 15: Neutralización de la adhesión celular por parte de anticuerpos anti-E-selectina humanizados en flujo fisiológico

[00447] Se realizaron estudios de rodamiento/adhesión celular *ex vivo* para evaluar la potencia y la actividad neutralizante de los anticuerpos 0841 y 0164 para inhibir la adhesión de células HL-60 a células CHO de E-selectina humana mediante el uso de un sistema de flujo fisiológico.

[00448] Las células CHO de E-selectina humana se mantuvieron en medio Alpha/10 % de suero fetal bovino dializado (GIBCO)/penicilina/estreptomicina (1X) y metotrexato 100 nM a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Las placas BioFlux™ se recubrieron con 50 µg/ml de fibronectina en PBS a una velocidad de flujo de 1 dina/cm² y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepararon células de ovario de hámster chino que expresan E-selectina humana (células CHO de E-selectina humana) para el ensayo mediante tratamiento con una relación 1:1 de 0,05 % de tripsina-ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y StemPro Accutase (Gibco; A1110501) durante 5 minutos a 37 °C, se neutralizaron con un volumen igual de medio de crecimiento, se recolectaron, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se volvieron a suspender hasta una concentración final de ~30 x 10⁶ células/ml en medio de crecimiento. Las placas se perfundieron dos veces con medio de crecimiento de CHO de E-selectina humana a 1 dina/cm² durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se retiró todo el medio y se perfundieron 30 µl de células CHO de E-selectina de humana (a ~30 x 10⁶ células/ml) durante 25 segundos a 3-4 dina/cm². Las placas se retiraron del instrumento y se incubaron a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂ durante 1 hora. Se retiró el medio y se agregaron 500 µl de medio de crecimiento nuevo y las células se incubaron a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂ durante la noche. Después de la incubación, las monocapas de CHO-E se lavaron (3-4 dinas/cm²) en el instrumento BioFlux con medio de crecimiento nuevo. El anticuerpo 0841 (diluciones en serie), el anticuerpo de control de isotipo y el anticuerpo de control de IgG1 (200 nM), en PBS y el control de vehículo, se

perfundieron a 1 dina/cm² durante 1 hora.

[00449] Las células HL-60 se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad en medio de crecimiento RPMI/glutamina (Gibco) con 10 % de suero bovino fetal (Gibco); y 1X penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se mantuvieron a 37 °C antes de la perfusión. Las células HL-60 se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se tiñeron con Calcein AM (Life Technologies™; C3099) durante 30 minutos, se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS; Gibco) y se volvieron a suspender hasta una concentración de 3 x 10⁶ células/ml en PBS. También se agregaron reservas de anticuerpos diluidos a la suspensión celular antes de la perfusión en las cámaras de flujo. Se perfundieron una alícuota de 100 µl de células HL-60, más inhibidor, en cada canal durante 10 minutos a un flujo de cizallamiento fisiológico de 1 dina/cm². La PBS se perfundió durante 2-3 minutos a 1 dina/cm² para eliminar las células no adherentes y las placas se sometieron a análisis por imágenes y se analizaron como se describe. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

[00450] Los anticuerpos 0841 y 0164 inhibieron la neutralización de células HL-60 contra células CHO que expresan E-selectina humana en condiciones de flujo fisiológico con valores de IC₅₀ estimados de 4,17 y 3,73 nM, respectivamente (Tabla 14).

[00451] **Tabla 14.** Fijación y neutralización por el anticuerpo 0841 y 0164.

anticuerpo	neutralización estática		neutralización en flujo fisiológico	fijación de anticuerpo a la superficie celular por FACS	
	células CHO de E-selectina humana de adhesión al ligando sialil Lewis IC ₅₀ (nM)	células CHO de E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> de adhesión al ligando sialil Lewis IC ₅₀ (nM)	Adhesión de células HL-60 a células CHO de E-selectina humana IC ₅₀ (nM)	fijación a células CHO de E-selectina humana EC ₅₀ (nM)	fijación a células CHO de E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> EC ₅₀ (nM)
0841	3,81	1,74	4,17	1,62	1,54
0164	5,17	2,00	3,73	1,39	1,73

Ejemplo 16: Caracterización biofísica de anti-E-selectina humanizada

Estabilidad térmica

[00452] Se usó calorimetría diferencial de barrido para determinar la estabilidad del anticuerpo humanizado 0841 (que comprende la secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 22 y la secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 17). Para este análisis, se dispensaron muestras a 0,3 mg/ml en una bandeja de muestras de un DSC MicroCal VP-Capillary con un automuestreador (Malvern Instruments, Inc.), se

equilibraron durante 5 minutos a 10 °C y luego se sometieron a un barrido hasta 110 °C a una velocidad de 100 °C por hora. Se seleccionó un período de filtración de 16 segundos. Se corrigieron al inicio los datos sin procesar, y se normalizó la concentración proteica. Se usó Origin Software 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para adaptar los datos a un modelo MN2-State con la cantidad adecuada de transiciones. La Tabla 15 a continuación muestra las temperaturas de fusión (T_{m1} - T_{m4} y FAB) de la molécula en amortiguador de Tris/Suc (Tris 20 mM, 8,5 % de sacarosa, a pH 7,5) amortiguador de His/Suc (histidina 20 mM, 8,5 % de sacarosa, 0,005 % de EDTA a pH 5,8) y amortiguador de Glu/Tre (ácido glutámico 20 mM, 8,5 % de trehalosa, a pH 4,5). Esta molécula mostró buena estabilidad, con la primera transición en el dominio CH2 (T_{m1}) mayor de 65 °C en los amortiguadores de Tris/Suc y Glu/Tre y apenas menor de 65 °C en el amortiguador de Glu/Tre.

[00453] **Tabla 15.** Transiciones térmicas del anticuerpo humanizado 0841.

formulación	$T_{m1}(^{\circ}\text{C})$	$T_{m2}(^{\circ}\text{C})$	$T_{m3}(^{\circ}\text{C})$	$T_{m4}(^{\circ}\text{C})$	$T_{m\text{ Fab}}(^{\circ}\text{C})$
Tris/Suc	$75,04 \pm 0,24$	$77,99 \pm 0,04$	$85,31 \pm 0,03$	---	77,8
His/Suc	$68,65 \pm 0,05$	$77,48 \pm 0,24$	$79,44 \pm 0,08$	$84,65 \pm 0,09$	78,9
Glu/Tre	$64,78 \pm 0,13$	$77,44 \pm 0,21$	$79,71 \pm 0,10$	---	79,0

Degradación forzada

[00454] El anticuerpo humanizado 0841 se dializó ampliamente en tres amortiguadores: Tris (Tris 20 mM a pH 7,5), His (histidina 20 mM a pH 5,8) y Glu (ácido glutámico 20 mM a pH 4,5) para un estudio de degradación forzada de 4 semanas a 40 °C. Después de la diálisis, las concentraciones de la muestra se ajustaron a 5 mg/ml. En las semanas T0, T2 y T4, se tomaron muestras para cromatografía de exclusión por tamaño analítica (aSEC), electroforesis capilar en imágenes (iCE) y pruebas de bioensayo.

[00455] El estado de agregación de las muestras calentadas se determinó mediante aSEC. Las muestras se inyectaron en una columna YMC-Pack Diol-200 (300 x 8,0 mm, tamaño de poro 200 Å) conectada al sistema HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con fosfato de sodio 20 mM, arginina 400 mM a pH 7,2 como fase móvil. Se aplicó un programa isocrático a una velocidad de flujo de 0,75 ml/minuto durante 20 minutos a la columna de aSEC para la elución de las muestras, y los datos se analizaron mediante el uso del software Agilent OpenLAB Data Analysis para integrar y cuantificar el área pico de agregado, proteína de interés y especies de bajo peso molecular. Todas las muestras mostraron un cambio mínimo en el % de HMMS (especies de masa molecular alta) y el % de LMMS (especies de masa

molecular baja), es decir, el porcentaje fue menor de 5 % (Tabla 16).

[00456] **Tabla 16.** aSEC de una muestra de degradación forzada en la semana T4 de 0841 humanizado.

	anticuerpo 0841 (HC SEQ ID NO: 22; LC ID SEQ NO: 17)		
formulación	concentración (mg/ml)	% de HMMS	% de LMMS
Tris pH 7,5	5	3,05	0,48
His pH 5,8	5,2	2,75	0,39
Glu pH 4,5	5,3	2,73	0,84

[00457] Se utilizó iCE para detectar la heterogeneidad basada en la carga de las muestras de degradación forzada. iCE separa las especies con carga de proteína en tensión alta y detección a una absorbancia de 280 nm. Los anfolitos portadores producen un gradiente de pH y las proteínas migran hasta que su carga neta es cero. Se analizaron los electroferogramas para determinar los valores de pI y las áreas pico de las especies ácidas, principales y básicas. Se utilizó el instrumento Protein Simple iCE3 con automuestreador PrinCE para analizar las muestras. Las proteínas se diluyeron a 2 mg/ml en agua. El diluyente de la muestra contenía 0,01 mg/ml de marcador pI 4,65, 0,01 mg/ml de marcador pI 9,5, 4,0 % de Pharmalyte pH 3-10, 0,25 % de metilcelulosa y urea 2,0 M. Las muestras contenían 15 µl de proteína a 2 mg/ml y 85 µl de diluyente de muestra. Las muestras se enfocaron durante 1 minuto a 1500 voltios y luego 6 minutos a 3000 voltios. Se utilizó el software Empower para el análisis de datos.

[00458] Para las muestras con un alto porcentaje de especies ácidas/básicas en el análisis iCE, se requirió un análisis de espectroscopía de masas adicional para identificar los riesgos de secuencia en las regiones CDR. El análisis de muestras en los amortiguadores de histidina y ácido glutámico mostró aumentos típicos en especies ácidas y básicas. Sin embargo, hubo un aumento mayor en especies básicas de lo esperado para un anticuerpo estable en el amortiguador de Tris, lo que sugiere una posible modificación química (Tabla 17). Las muestras en los tres amortiguadores se analizaron adicionalmente mediante el uso de análisis de espectroscopía de masas en tres partes y mapeo de péptidos.

[00459] **Tabla 17.** Análisis iCE de muestras de degradación forzada de anticuerpo humanizado 0841 (HC de SEQ ID NO: 22 y LC de SEQ ID NO: 17).

anticuerpo 0841	40 °C	pI	% de especies ácidas	% de especies principales	% de especies básicas
Tris, pH 7,5	Semana T0	8,8	23,6	72,1	4,3
	Semana T2	8,8	37,4	51,9	10,7
	Semana T4	8,8	45,3	41,4	13,3
His, pH 5,8	Semana T0	8,9	24,3	71,5	4,2
	Semana T2	8,9	32,9	60,8	6,3
	Semana T4	8,9	40,9	51,7	7,4
Glu, pH 4,5	Semana T0	8,8	24,2	71,3	4,4
	Semana T2	8,8	35,1	56,0	8,9
	Semana T4	8,8	42,0	47,3	10,8

Análisis de espectrometría de masas

[00460] Para el análisis de espectroscopía de masas de 3 partes, los anticuerpos se digirieron mediante el uso de FabALACTICA. Se agregaron 50 µg de anticuerpo mAb a NaPO₄ 100-150 mM pH 7,0 para un volumen de 25 µl. Se agregaron 1,5 µl de enzima FabALACTICA (40 U/µl) y se incubaron durante la noche (16-18 horas) a 37 °C con agitación suave. Después de esto, se agregaron 50 µl de Guan-HCl 8 M, 12,5 µl de DTT 1 M y 12,5 µl de amortiguador de fosfato de sodio 150 mM pH 7,0. Esto se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. Se utilizaron 7-8 µg (alrededor de 15 µl) para el análisis de espectrometría de masas por cromatografía líquida de 3 partes (LC-MS).

[00461] El análisis LC-MS se realizó mediante el uso de un espectrómetro de masas Bruker maXis II (Bruker, Billerica, MA) acoplado a un UPLC Waters H-Class (Waters, Milford, MA). Las muestras digeridas y reducidas con FabALACTICA se separaron en una columna Waters BEH C4 (1,7 Å, 2,1 x 150 mM) mantenida a 65 °C con una velocidad de flujo de 300 µl/min. La fase móvil A era agua con 5 % de acetonitrilo y 0,05 % de TFA, la fase móvil B era acetonitrilo:2-propanol al 50:50 y 0,05 % de TFA. El espectrómetro de masas se ejecutó en modo único de MS positiva y los datos se adquirieron con el software de control oTOF. La señal TOF-MS se deconvolucionó mediante el uso de la máxima entropía en Compass DataAnalysis v 4.2 (Bruker). El análisis de las muestras 0841 de degradación forzada en amortiguador de ácido glutámico, histidina y Tris a las cuatro semanas (T4W) mostró perfiles similares en comparación con las muestras en el tiempo 0 (T0) (**Figura 2**). PyroE-Fd (fragmento Fd de la cadena pesada de IgG con ácido piroglutámico (PyroE) en el terminal N) mostró un ligero aumento en las muestras de T4W, particularmente en el amortiguador de Tris (~3,5 %). Además, se detectó alrededor de 5 % de clip Fd D/P

(fragmento Fd con sitio de ácido aspártico/prolina (D/P) escindido) en las muestras T0 y T4W.

Mapeo de péptidos por LC-MS

[00462] Para investigar más a fondo la estabilidad de la muestra, se utilizó LC-MS de mapeo de péptidos. Para el mapeo de péptidos, se llevó a cabo la desnaturalización y reducción del anticuerpo 0841 en Guan:HCl NaAc 5 M, pH 5,0, TCEP 10 mM a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó 10 veces con MES 100 mM, pH 6,0, amortiguador de TCEP 0,5 mM. A continuación, se agregó la mezcla de LysC/tripsina en una relación de 1:10 seguida de una digestión durante la noche a 37 °C. La reacción se inactivó con 0,5 % de TFA/H₂O (concentración final). Esta mezcla de digestión se inyectó luego en Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos para el análisis LC-MS.

[00463] El análisis de mapeo de péptidos mediante LC-MS se realizó mediante el uso de un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, Waltham, MA) acoplado a un UPLC Waters H-Class (Waters, Milford, MA). Las muestras digeridas se separaron en una columna Waters BEH C18 (300 Å, 1,7 µm, 2,1 x 150 mM) mantenida a 60 °C con una velocidad de flujo de 200 µl/min. La fase móvil A era 0,05 % de TFA en agua y la fase móvil B era 0,05 % de TFA en acetonitrilo. Los péptidos se eluyeron de la columna mediante el uso de un gradiente: de 0,5 % a 35 % de B en 135 minutos. El espectrómetro de masas se ejecutó en modo único de MS positiva que barrió de 300 a 1600 m/z, y los datos se adquirieron con el software Xcalibur. El análisis de datos y la búsqueda en la base de datos se realizaron mediante el uso del software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) y Peaks AB (Bioinformatics Solutions Inc, Toronto, Canadá).

[00464] El análisis de mapeo de péptidos de alta fidelidad de muestras de T4W para amortiguador de Tris, histidina y ácido glutámico identificó cantidades mínimas de desamidación (<1 %) en un péptido de CDR2 de HC con la secuencia IDPAN*GNTIYAEK (el sitio de desamidación NG está subrayado; SEQ ID NO: 176). NG es un sitio de desamidación común, pero en este caso fue mayormente estable. Se detectó una posible desamidación (en forma de succinimida-N) en un péptido de CDR1 de LC con la secuencia TSQNIN*RYLNWYQQKPGK (el sitio de desamidación NR está subrayado; SEQ ID N: 177), la desamidación aumentó hasta alrededor de 5,1 % en la muestra de Tris T4W (el espectro MS2 indicó que el sitio N(30)R era el sitio de desamidación más probable; sin embargo, N28 y N34 también podrían tener potencialmente cantidades mínimas de desamidación) (Tabla 18).

[00465] **Tabla 18.** Mapeo de péptidos mediante LC/MS de muestras de degradación forzada del anticuerpo humanizado 0841.

Péptido de CDR2 de HC	% de péptido regular	% de desamidación	% de péptido de succinimida	péptido desamidado total
T0	99,74 %	0,07 %	0,15 %	0,26 %
Glu T4W	99,62 %	0,18 %	0,16 %	0,38 %
His T4W	99,59 %	0,16 %	0,17 %	0,41 %
Tris T4W	99,36 %	0,30 %	0,15 %	0,65 %
Péptido de CDR1 de LC	% de péptido regular	% de desamidación	% de péptido de succinimida	péptido desamidado total
T0	99,12 %	0,00 %	0,88 %	88,00 %
Glut T4W	98,08 %	0,00 %	1,48 %	1,48 %
His T4W	95,20 %	0,08 %	3,95 %	4,03 %
Tris T4W	93,46 %	0,27 %	4,85 %	5,12 %

ELISA de fijación competitiva

[00466] Para evaluar adicionalmente la estabilidad de las muestras de degradación forzada, se evaluó la actividad de las muestras sometidas a estrés en un ELISA de fijación competitiva. Aquí se comparó la estabilidad de las muestras T0, T2W y T4W en cuanto a su capacidad para competir con el anticuerpo quimérico biotinilado 0164 (que comprende HC SEQ ID NO: 34 y LC SEQ ID NO: 31) para fijarse a E-selectina humana. La E-selectina humana se almacenó en PBS con Ca/Mg a 500 µg/ml y se diluyó con PBS con Ca/Mg hasta una concentración de 1 µg/ml. Esto se agregó a una placa MaxiSorp de 384 cavidades, se selló y se incubó a 4 °C con agitación suave durante la noche. Al día siguiente, se retiraron los reactivos de cada cavidad, seguido de la adición de 50 µl de amortiguador de bloqueo (1 % de BSA en PBS con Ca/Mg) a cada cavidad. Las cavidades se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante alrededor de 1 hora con agitación suave. A una concentración inicial de 0,2 mg/ml, el anticuerpo 0841 se diluyó en serie en etapas de diluciones 1/3 con PBS con Ca/Mg para un total de 12 concentraciones.

[00467] El anticuerpo biotinilado 0164 se diluyó a 0,04 µg/ml en 2 % de BSA/PBS con Ca/Mg. Se mezclaron volúmenes iguales del anticuerpo 0841 diluido con el anticuerpo 0164 biotinilado. Luego, la placa de lavado se bloqueó con 1 % de BSA con PBST (0,05 % de Tween) en un TITERTEK durante 3 ciclos mediante el uso de 80 µl para cada lavado. La placa se golpeó suavemente sobre una toalla de papel para escurrir. Se agregaron veinticinco µl de la mezcla del anticuerpo 0841 y el anticuerpo 0164 etiquetado con biotina a cada cavidad de la placa de 384 cavidades,

en cavidades duplicadas y se incubaron a temperatura ambiente con agitación suave durante 2-4 horas. La etapa de lavado se repitió con 3 ciclos de 2 lavados. A continuación, se agregó a cada cavidad estreptavidina-HRP diluida (~1/7500 diluida en amortiguador de bloqueo) y la placa se incubó a temperatura ambiente con agitación suave ~40 minutos a 1 hora. La etapa de lavado se repitió nuevamente con 3 ciclos de 2 lavados, se compactó en seco y luego se agregaron 25 µl de sustrato de TMB (un sustrato de microcavidades HRP de un componente). Luego se agregaron 25 µl de ácido sulfúrico 0,18 M para detener la reacción cuando el color alcanzó saturación (lo cual se determinó observando el desarrollo del color). La medición OD450 de la placa se leyó luego en el lector de placas Envision, y los datos se analizaron con GraphPad, Prism7.

[00468] Los resultados de fijación competitiva se muestran en la **Figura 3** y no se observaron diferencias entre las muestras T0, T2W y T4W en ninguno de los tres amortiguadores. Estos datos demuestran que el anticuerpo 0841 retuvo su capacidad para fijarse a la E-selectina luego del almacenamiento en condiciones de alta temperatura (es decir, 40 °C).

Estabilidad de concentración alta

[00469] El anticuerpo humanizado 0841 se dializó ampliamente en tres amortiguadores, Tris/Suc (Tris 20 mM, 8,5 % de sacarosa, a pH 7,5), His/Suc (histidina 20 mM, 8,5 % de sacarosa, 0,005 % de EDTA, a pH 5,8) y Glu/Tre (ácido glutámico 20 mM, 8,5 % de trehalosa, a pH 4,5). Luego de la diálisis, las muestras se concentraron hasta 150 mg/ml mediante una concentradora de filtro rotativo y se almacenaron a 4 °C y 25 °C. En las semanas T0, T1, T2, T4 y T6, se tomaron muestras para análisis aSEC en tiempo real.

[00470] El estado de agregación de las muestras de concentración alta se determinó mediante aSEC como se describió anteriormente para el análisis de degradación forzada. Las muestras almacenadas a 4 °C y 25 °C fueron estables en concentración alta en las semanas T6 (T6W) con poco aumento en el porcentaje de HMMS (<5 %) en las tres condiciones de amortiguador (Tabla 19).

[00471] **Tabla 19.** Análisis aSEC de muestras de concentración alta de anticuerpo humanizado 0841 (SEQ ID NO: 22 de HC, SEQ ID NO: 17 de LC) en las semanas T0 y T6.

	anticuerpo 0841			
formulación	concentración (mg/ml)	% de HMMS T0	% de HMMS T6W 4 °C	% de HMMS T6W 25 °C
Tris/Suc, pH 7,5	149,6	3,3	3,99	4,66
His/Suc, pH 5,8	157,1	3,2	3,34	3,56
Glu/Tre, pH 4,5	150,5	3,1	3,24	3,37

[00472] En las semanas T0, T3 (T3W) y T6, las muestras se analizaron mediante iCE y electroforesis en gel capilar (CGE). iCE se utilizó para detectar heterogeneidad a base de carga de las muestras de concentración alta mediante un método similar al método utilizado en el estudio de degradación forzada. Se observaron cambios mínimos en el % de especies ácidas y el % de especies básicas durante 6 semanas de almacenamiento a 25 °C en amortiguadores His/Suc y Glu/Tre, y los cambios grandes estuvieron asociados con el amortiguador Tris/Suc en las especies ácidas y básicas (Tabla 20).

[00473] **Tabla 20.** Análisis iCE de muestras de concentración alta de anticuerpo humanizado 0841 (SEQ ID NO: 22 de HC, SEQ ID NO: 17 de LC).

anticuerpo 0841	tiempo de muestro a 25 °C	pI	% de especies ácidas	% de especies principales	% de especies básicas
Tris/Suc, pH 7,5	semanas T0	9,0	25,8	69,9	4,3
	semanas T3	9,0	32,3	60,7	6,9
	semanas T6	9,0	37,6	53,1	9,3
His/Suc, pH 5,8	semanas T0	9,0	25,9	69,4	4,7
	semanas T3	9,0	27,6	67,2	5,1
	semanas T6	9,0	28,7	65,6	5,7
Glu/Tre, pH 4,5	semanas T0	9,0	25,6	69,6	4,8
	semanas T3	9,0	28,0	65,8	6,2
	semanas T6	9,0	30,1	63,1	6,9

[00474] Se llevó a cabo CGE para determinar la fragmentación de las muestras de concentración alta del anticuerpo 0841. Las muestras se analizaron con LabChip Touch HT Protein Express Assay de Perkin Elmer. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las muestras se prepararon mediante un método modificado. Brevemente, se mezclaron 5 µl de la muestra a 1 mg/ml con 35 µl de amortiguador de muestra que contenía tanto yodoacetamida para CGE no reductora (nrCGE), o ditiotretitol para CGE reductora, y se los incubó a 70 °C durante 10 minutos. Luego de calentarse, se agregaron 70 µl de agua desionizada a cada muestra antes de su análisis con el sistema Touch. El tamaño y nivel de fragmentación de cada muestra se cuantificó con el *software* LabChip GX.

[00475] La cuantificación del % de fragmentación y % de HMMS demostró que el anticuerpo 0841, en una concentración alta, fue estable en los tres amortiguadores (Tabla 21).

[00476] **Tabla 21.** Análisis CGE de muestras de concentración alta de anticuerpo humanizado 0841 (SEQ ID NO: 22 de HC, SEQ ID NO: 17 de LC).

% de fragmentación (25 °C)				
	nrCGE	Tris/Suc pH 7,5	His/Suc pH 5,8	Glu/Tre pH 4,5
anticuerpo 0841	semanas T0	0,49	0,87	0,51
	semanas T3	0,75	0,3	0,75
	semanas T6	1,1	0,31	1,69
% de HMMS (25 °C)				
	nrCGE	Tris/Suc pH 7,5	His/Suc pH 5,8	Glu/Tre pH 4,5
anticuerpo 0841	semanas T0	0,03	0,03	0
	semanas T3	0,31	0	0
	semanas T6	0	0,38	0

Ejemplo 17: Riesgo de inmunogenicidad *in silico* y predicción de epítipo de linfocito T de anti-E-selectina humanizada.

[00477] El riesgo de inmunogenicidad del anticuerpo anti-E-selectina humanizado 0841 se predijo mediante herramientas *in silico* para la predicción de la fijación de péptido MHCII. Se utilizaron las siguientes herramientas: (1) para identificación de epítipo de fijación potencial a MHCII para cada péptido individual en la secuencia, (2) para clasificación de epítipo, para evaluar el riesgo potencial de aglutinantes de péptido de MHCII y (3) para puntuación global de secuencia, para predecir el riesgo global de que la secuencia entera tenga riesgo de inmunogenicidad asociado a la fijación a MHCII. Los métodos se describen a continuación.

Identificación del epítipo

[00478] Las secuencias se analizaron mediante dos protocolos (descritos a continuación) para identificar epítipos. Cualquier secuencia marcada por las reglas descritas en la presente para cualquiera de los protocolos se consideró un epítipo. Estos métodos examinan secuencias principalmente al nivel de 9 meros de aminoácido.

Protocolo 1: ISPRI/EpiMatrix

[00479] Las secuencias se enviaron para el análisis EpiMatrix en el paquete de software ISPRI (ISPRI v 1.8.0, EpiVax Inc., Providence, RI (2017); Schafer JRA *et al.* (1998) Vaccine 16(19): 1880-84). Los resultados sin procesar proporcionaron una clasificación de probabilidad de fijación de cada fragmento de aminoácido 9 mero

frente a 8 tipos diferentes de HLA. Por lo tanto, hubo 8 predicciones ("observaciones") para cada 9 mero. Los 9 meros se generaron a partir de cada posición de numeración lineal individual de la secuencia (por lo tanto, fue posible que el mismo 9 mero ocurra más de una vez en la misma secuencia). Si 4 observaciones cualesquiera indicaron que el 9 mero estaba en el 5 % superior de los aglutinantes (lo que significa que se predijo que estaría en el 5 % superior de los aglutinantes para al menos 4 tipos de HLA), el 9 mero se consideró un epítipo previsto ("epítipo"). De manera alternativa, si 1 de las 8 predicciones indicó que el 9 mero estaba en el 1 % superior de los aglutinantes, el 9 mero también se consideró un epítipo previsto.

Protocolo 2: Método de consenso IEDB

[00480] Las secuencias se enviaron para su análisis mediante el método de consenso de fijación de MHC-II (Wang P. *et al.* (2010) BMC Bioinformatics 11: 568; Wang P. *et al.* (2008) PLoS Comput. Biol. 4(4),e1000048) en IEDB (Vita R. *et al.*, Nucleic Acids Res. 2015; 28 (43): D405-12; IEDB MHC-II Binding Predictions, www.iedb.org). El resultado del *software* organizó los resultados por 15 meros. Se proporcionó una puntuación de consenso y una clasificación percentil para cada combinación de 15 mero y tipo de HLA. Las puntuaciones individuales a partir de las cuales se obtuvo el consenso de cada 15 mero fueron las clasificaciones de ciertos 9 meros que se encuentran en el 15 mero: cada método utilizado para el consenso informó un rango percentil para un 9 mero dentro de los 15 meros. El consenso tomado como valor para el 15 mero total fue la predicción para el 9 mero que tiene la mediana de puntuación. Se clasificó un 9 mero como un epítipo si (a) se eligió como el representativo del consenso para el 15 mero Y (b) tuvo una clasificación de percentiles en el 10 % superior de los aglutinantes para el tipo de HLA en consideración, Y si los criterios (a) y (b) ocurrieron para tres o más tipos distintos de HLA para el mismo 9 mero (es decir, tres observaciones). Los tipos de HLA considerados fueron DRB1*01, 1*03, 1*04, 1*07, 1*08, 1*11, 1*13, y 1*15, que fueron los mismos tipos de HLA en un informe ISPRI/EpiMatrix estándar. Por lo tanto, aunque el resultado primario del método fue una clasificación de 15 meros, se reinterpretaron los datos para obtener una lista de epítipos de 9 meros previstos, para facilitar la comparación con el Protocolo 1.

Clasificación del epítipo

[00481] Se clasificó cada epítipo como un epítipo de línea germinal o no de línea germinal. Para los anticuerpos, se clasificó además cada epítipo en función de su ubicación dentro del anticuerpo (CDR o no CDR). Se filtraron secuencias de

dominios V humanos obtenidos de IMGT (www.imgt.org) para eliminar líneas germinales anotadas como pseudogenes o marcos de lectura abiertos (ORF). Cualesquier epítomos 9 meros previstos hallados en las secuencias restantes se consideraron un epítomo de línea germinal. Los epítomos hallados en las regiones J o C (que incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) o las uniones entre estas regiones también se clasificaron como epítomos de línea germinal. De lo contrario, un epítomo se clasificó como un epítomo que no es de línea germinal. Los residuos del dominio variable se numeraron en función del sistema de numeración Kabat (Kabat EA, *et al.* (1991) US Department of Health and Human Services, publicación NIH N.º 91-3242). Luego de la numeración, las CDR de modo de incluir los siguientes residuos: CDR-H1 (H26-H35, que incluye inserciones tales como H35A, hasta H36 no inclusive), CDR-H2 (H50-H65 inclusive), CDR-H3 (H95-H102 inclusive), CDR-L1 (L24-L34 inclusive), CDR-L2 (L50-L56 inclusive), CDR-L3 (L89-L97 inclusive). Un epítomo de 9 mero previsto fue un epítomo CDR si alguno de sus aminoácidos formó parte de una región CDR. Cabe destacar que la posición de inicio elegida (H26) para CDR-H1 difiere de algunas otras publicaciones que usan la anotación Kabat.

Puntuación global de secuencia (puntuación ajustada en función de T-Reg)

[00482] Para una cadena individual, o para un apareamiento de dominios VH y VL del anticuerpo, se calculó una puntuación global al sumar cada uno de los 9 meros constituyentes de la siguiente manera. Se examinaron todas las combinaciones individuales de 9 mero y tipo de HLA ("observaciones"), independientemente de si el 9 mero fue un epítomo. Si una observación particular indicó que el péptido está en el 5 % superior de los aglutinantes para el tipo de HLA dado, la puntuación EpiMatrix Z para esta observación se sumó a un total acumulado asociado con la secuencia de proteínas completa. También se registró la cantidad total de observaciones examinadas. La única excepción fue que se asumió que todas las observaciones de 9 meros identificados por ISPRI como "T-regítomos" tuvieron puntuaciones de EpiMatrix de cero. En el total acumulado, se restó una puntuación de referencia de $0,05 * 2,2248$ de cada observación (incluidos los T-regítomos). La puntuación final se calculó de la siguiente manera:

[00483] Puntuación T-reg ajustada = $(\text{total acumulado}) * 1000 / (\text{cantidad de observaciones})$

[00484] Las puntuaciones más bajas indicaron un potencial inmunogénico previsto más bajo. Cabe destacar que la puntuación solo incluyó predicciones de ISPRI/EpiMatrix, y no incluyó información de IEDB. Por lo tanto, ningún aglutinante

HLA fuerte previsto por IEDB, pero no por ISPRI, contribuyó a la puntuación. En teoría, las secuencias pueden contener muchos aglutinantes HLA previstos por IEDB y aun así tener una puntuación ajustada en función de T-reg favorable si EpiMatrix no predice también que las mismas secuencias sean probablemente aglutinantes.

[00485] Estas herramientas se utilizaron para predecir la cantidad de epítomos de linfocitos T que no son de línea germinal y la puntuación global de secuencia en el anticuerpo humanizado 0841 (que comprende la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 25 y secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 21). Mediante los dos protocolos, se identificaron 8 epítomos que no son de línea germinal en las secuencias de VH y VL (H27: YNIRSSYMH (SEQ ID NO: 178), H63: FKIRFTISA (SEQ ID NO: 179), H65: IRFTISADN (SEQ ID NO: 180), L29: INRYLNWYQ (SEQ ID NO: 181), L46: LLIYNANSL (SEQ ID NO: 182), L47: LIYNANSLQ (SEQ ID NO: 183), L48: IYNANSLQT (SEQ ID NO: 184) y L49: YNANSLQTG (SEQ ID NO: 185) (**Figura 4**). De manera adicional, la puntuación global de secuencia fue -30,34. Se prevé que la reducción en la cantidad de epítomos y la puntuación global de secuencia reducirá el riesgo general de inmunogenicidad de la secuencia.

Ejemplo 18: Optimización de anticuerpos anti-E-selectina humanizados.

Mutagénesis racional a base de estructura del anticuerpo 0841

[00486] El anticuerpo anti-E-selectina 0841 contenía diversos epítomos de linfocitos T previstos que pueden aumentar el riesgo de inmunogenicidad cuando se administra a un sujeto. Estos incluyeron 8 epítomos que no son de línea germinal contenidos en las secuencias de VH y VL (H27: YNIRSSYMH, H63: FKIRFTISA, H65: IRFTISADN, L29: INRYLNWYQ, L46: LLIYNANSL, L47: LIYNANSLQ, L48: IYNANSLQT y L49: YNANSLQTG). Además, el mapeo de péptidos del anticuerpo tras la degradación forzada por calor identificó un riesgo de desamidación NR en la posición L30. Además del riesgo de desamidación NR en L30, se identificaron otros sitios de riesgo potenciales que incluyen un sitio NG en la posición H54 de la cadena pesada, un sitio NS en la posición L52 y un sitio NS en la posición L92. Los métodos de optimización a base de estructura se utilizaron para eliminar los epítomos de linfocitos T previstos y los sitios de riesgo de secuencia.

[00487] En principio, sin embargo, se generó un anticuerpo humanizado adicional, 0978 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 28 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 26), que atraviesa la línea germinal de CDR-L2 hasta DPK9 CDR-L2 (AASSLQS (SEQ ID NO: 3) y el extremo de CDR-H2 hasta la secuencia DP-54 de (H59-H65 YVDSVKG (SEQ ID

NO: 186)). El anticuerpo 0978 demostró mantener una fijación similar al anticuerpo 0841 según el ensayo de fijación competitiva descrito en el Ejemplo 16. Atravesar la línea germinal de estos dos tramos eliminó 5 de los epítomos de linfocito T previstos (H63: FKIRFTISA (SEQ ID NO: 179), L46: LLIYNANSL (SEQ ID NO: 182), L47: LIYNANSLQ (SEQ ID NO: 183), L48: IYNANSLQT (SEQ ID NO: 184) y L49: YNANSLQTG (SEQ ID NO: 185) pero introdujo un nuevo epítomo de linfocito T previsto (H63: VKGRFTISA (SEQ ID NO: 187)). De manera adicional, la mutación de L2 eliminó el sitio de riesgo NS potencial en la posición L52, pero la mutación del extremo de H2 agregó un sitio DS en la posición H61 que era otro sitio de riesgo potencial. La optimización a base de estructura se llevó a cabo en el anticuerpo 0978 mediante una estructura de cristal de rayos X del anticuerpo 0164 fijado al dominio de lectinas tipo C de E-selectina (residuos 22-178) para eliminar los 3 epítomos de linfocitos T previstos restantes y los riesgos de secuencia.

[00488] Para determinar posiciones adecuadas para la mutagénesis, la predicción computacional de mutaciones para tanto los cambios en afinidad como los cambios en estabilidad se llevó a cabo mediante Discovery Studio 4.5 (Dassault Systems Biovia Corp.) y FoldX. Las mutaciones toleradas son aquellas que, según se predice, no tendrán $\Delta\Delta G > 1$ kcal/mol, en función de los métodos Discovery Studio y FoldX. A partir de estas predicciones, se identificó un conjunto de residuos que tendrían, según las previsiones, un impacto mínimo sobre la fijación y estabilidad, al tiempo que eliminarían los epítomos de linfocitos T previstos y riesgos de secuencia, y se lo muestra en la Tabla 22.

[00489] **Tabla 22.** Listado de mutaciones previstas para eliminar motivos de riesgos de secuencia o epítomos de linfocitos T previstos identificados a través de diseño racional a base de estructura.

Característica	WT	Mutante
Motivo NR de sitio de desamidación L30	L30 NR	L30 ER
Motivo NS de sitio de desamidación L92	L92 NS	L92 NA
Motivo DS de sitio de isomerización H61	H61 DS	H61 ES
Epítomo de linfocitos T previsto H27	H27: YNIRSSYM (SEQ ID NO: 178)	H27: YAIRSAYMH (SEQ ID NO: 188)
Epítomo de linfocitos T previsto H63	H63: VKGRFTISA (SEQ ID NO: 187)	H63: VEGRFTISA (SEQ ID NO: 189)
	H63: VKGRFTISA (SEQ ID NO: 187)	H63: VTGRFTISA (SEQ ID NO: 190)
	H63: VKGRFTISA (SEQ ID NO: 187)	H63: VKERFTISA (SEQ ID NO: 191)
Epítomo de linfocitos T previsto L29	L29: INRYLNWYQ (SEQ ID NO: 181)	L29: IERYLNWYQ (SEQ ID NO: 192)

[00490] Mediante este conjunto de mutaciones, se generaron 4 constructos optimizados que eliminaron los 3 riesgos de secuencia y los 3 epítomos de linfocitos T identificados en la Tabla 22. Estos constructos son el anticuerpo 1282 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 43 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1), anticuerpo 1284 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 40 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1), anticuerpo 1444 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 13 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1) y anticuerpo 1448 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1). Las mutaciones relacionadas con el anticuerpo 0978 se muestran en la Tabla 23. Se confirmó que la afinidad de fijación de estos mutantes es similar al anticuerpo 0978 mediante el ensayo de fijación competitiva descrito en el Ejemplo 16.

[00491] **Tabla 23.** Listado de nuevas secuencias optimizadas para eliminar epítomos de linfocitos T y riesgos de secuencia.

anticuerpo	Mutantes de HC	Mutantes de LC
1282	K64E	N30E, S93A
1284	D61E, K64E	N30E, S93A
1444	K64T	N30E, S93A
1448	G64E	N30E, S93A

Ejemplo 19: Neutralización de anticuerpos anti-E-selectina optimizados. (0164, 0841, 1282, 1284, 1444, 1448)

Neutralización de fijación de ligando a CHO con expresión de E-selectina de superficie celular

[00492] En un ensayo de adhesión celular de ligando estático, el ligando de E-selectina (antígeno sialil-Lewis) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y los anticuerpos contra E-selectina compiten por la fijación a E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* expresada en células de ovario de hámster chino (CHO). La capacidad de los anticuerpos anti-E-selectina para neutralizar la fijación al ligando se evaluó en un ensayo de neutralización estática mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) competitivo para evaluar la neutralización del antígeno sialil Lewis a las células de ovario de hámster chino (CHO) diseñadas por ingeniería genética para expresar E-selectina humana o de *Macaca fascicularis*.

[00493] Se cultivaron células CHO que expresan E-selectina humana en medio de crecimiento (MEM (medio esencial mínimo) Alpha Medium, complementado con

10 % (volumen/volumen) de suero bovino fetal dializado, metotrexato 100 nM y 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina). Se cultivaron células CHO con expresión de E-selectina de *Macaca fascicularis* en medio R1 (medio Eagle modificado de Dulbecco RI/modificación F12 de Ham) complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado con calor (GIBCO), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 125 µg/ml de zeocina (GIBCO).

[00494] Las células CHO que expresan E-selectina se sembraron a 12.500 células por cavidad en una placa de cultivo tisular de 96 cavidades y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas para formar una monocapa confluyente. Las placas se lavaron posteriormente dos veces con 200 µl de PBS libre de calcio y magnesio. Se agregaron anticuerpos anti-E-selectina o un control de isotipo IgG1 (control IgG) al ensayo en presencia de un pequeño conjugado sintético de poliacrilamida sialil-Lewis A (Carbosynth LLC, OS45446) o poliacrilamida sialil-Lewis X (Glycotech, 01-045), biotinilada, con estreptavidina/peroxidasa de rábano picante (100 µl en total), y se los incubó a 37 °C, 5 % de CO₂, durante 2 horas. Las placas se lavaron luego dos veces con 200 µl de PBS libre de calcio y magnesio. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con 200 µl de amortiguador de lavado que contenía cloruro de calcio 2 mM (TRIS [trisaminometano] 50 mM, cloruro de sodio 150 mM; 0,05 % de polisorbato 20, pH 7,4; cloruro de calcio 2 mM). La señal se desarrolló al agregar 100 µl de sustrato Ultra TMB de 1 etapa (Thermo Scientific, 34028) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron mediante el uso de ácido sulfúrico 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm (Spectramax M5e). Los datos se analizaron y graficaron con el *software* GraphPad Prism (versión 8.0.2). Los valores estimados de concentración inhibidora máxima media (IC₅₀) derivados del análisis variaron de 1,38 a 2,89 nM para E-selectina humana y de 1,85 a 2,65 nM para E-selectina de *Macaca fascicularis* (**Figura 5** y **Figura 6**) (Tabla 24).

[00495] **Tabla 24.** Neutralización de fijación de ligando a CHO con expresión de E-selectina de superficie celular

	neutralización estática de adhesión de ligando sialil-Lewis	
anticuerpo	IC ₅₀ (nM) de células CHO-E-selectina humana	Células CHO-E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> IC ₅₀ (nM)
0164	2,69	2,25
0841	2,56	NT
1282	1,38	1,29
1284	2,77	1,91
1444	2,89	2,65
1448	2,78	1,85
NT = no determinado en este ensayo		

[00496] En otros ensayos de neutralización estática, con métodos similares a los descritos anteriormente, el anticuerpo 1444 neutralizó la fijación de ligando a proteína E-selectina tanto humana como de *Macaca fascicularis* expresada por células CHO con un valor estimado de IC₅₀ de 1,88 nM – 2,33 nM y 1,47 nM – 1,49 nM, respectivamente.

Neutralización de fijación de ligando a proteínas recombinantes solubles

[00497] Se prepararon soluciones de reserva de E-selectina recombinante etiquetada con histidina; E-selectina de *Macaca fascicularis* (Sino Biologicals; 190169-C08H) y E-selectina humana (Sino Biologicals; 13025-H08H) a una concentración final de 3 µg/ml en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) sin calcio y magnesio. Se agregaron cien µl por cavidad de la proteína E-selectina recombinante diluida a una placa de 96 cavidades Ni-NTA HisSorb (Qiagen, 35061) y las placas se incubaron en una agitadora orbital a temperatura ambiente durante 2 horas. Biotina poliacrilamida sialil-Lewis A, un ligando de E-selectina sintético (GlycoTech corporation 01-044), se conjugó con estreptavidina HRP (peroxidasa de rábano picante) (Ultra Streptavidin HRP, Thermo Scientific N504) y se diluyó en un diluyente de ensayo que contenía cloruro de calcio 2 mM (amortiguador BD OptEIA; BD Biosciences, 555213).

[00498] También se elaboraron soluciones de reserva de anticuerpos concentradas dos veces (control IgG1, 0160, 1282, 1284, 1444 y 1448) en un diluyente de ensayo que contenía cloruro de calcio 2 mM. Después de la incubación, las placas se lavaron 5 veces con 200 µl de amortiguador de lavado que contenía cloruro de calcio 2 mM (TRIS [trisaminometano] 50 mM; cloruro de sodio 150 mM; 0,05 % de polisorbato 20, pH 7,4; cloruro de calcio 2 mM). Luego de esto, se agregaron en duplicado 100 µl de una mezcla del anticuerpo (control IgG1, 0160, 1282, 1284, 1444 y 1448) y sialil-Lewis A conjugado con HRP y las placas se incubaron sobre una agitadora orbital a temperatura ambiente durante 2 horas. La concentración de

anticuerpo final varió de 200 nM a 0,09 nM y la concentración final de sialil-Lewis A conjugado con HRP fue de 5 µg/ml. Las placas se lavaron como se menciona anteriormente, y se agregaron 100 µl por cavidad de sustrato Ultra TMB de 1 etapa (Thermo Scientific, 34028) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron con 100 µl de ácido sulfúrico 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm (Spectramax M5e). Los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism (versión 8.0.2). Se derivaron valores estimados de concentración inhibidora máxima media (IC₅₀) del análisis (Tabla 25).

[00499] Del análisis se derivaron valores estimados de concentración inhibidora máxima media (IC₅₀) y estos variaron de 2,96 nM a 3,59 nM para la neutralización con anticuerpo de la fijación de ligando a E-selectina humana recombinante soluble y de 2,74 nM a 3,29 nM para la neutralización con anticuerpo de fijación de ligando a E-selectina de *Macaca fascicularis* recombinante soluble.

[00500] **Tabla 25.** Neutralización de fijación de ligando a E-selectina recombinante soluble

	neutralización estática de adhesión de ligando sialil-Lewis	
anticuerpo	E-selectina humana recombinante - IC₅₀ (nM)	E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> recombinante - IC₅₀ (nM)
0164	3,39	3,29
1282	3,39	3,23
1284	3,59	3,39
1444	3,01	2,91
1448	2,96	2,74

[00501] En otros ensayos de neutralización estática, con métodos similares a los descritos anteriormente, el anticuerpo 1444 neutralizó la fijación de ligando a proteína E-selectina tanto humana como de *Macaca fascicularis* con un valor estimado de IC₅₀ de 2,87 nM – 2,91 nM y 2,39 nM – 2,45 nM, respectivamente.

Ejemplo 20: Evaluación cinética de anti-E-selectina optimizada mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales.

[00502] Se determinaron afinidades de fijación para E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* para los anticuerpos optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448 mediante SPR en un método similar al Ejemplo 4. Esto se hizo al fijar primero el anticuerpo a anti-IgG humana inmovilizado. Después de la captura de anticuerpo, las diluciones de las proteínas de E-selectina fluyeron y se determinaron los valores de la constante de velocidad de asociación (k_a), la constante de velocidad de disociación

(kd), $t_{1/2}$ y K_D respecto de la fijación a E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* (Tabla 26). En este análisis SPR, la afinidad de 1282, 1284, 1444 y 1448 a la E-selectina humana fue de 70,3 nM, 65,2 nM, 61,8 nM, y 60,5 nM, respectivamente. La afinidad de 1282, 1284, 1444 y 1448 a la E-selectina de *Macaca fascicularis* fue de 78,3 nM, 76,5 nM, 81,5 nM, y 67,8 nM, respectivamente.

[00503] **Tabla 26.** Afinidad de anticuerpos anti-E-selectina a E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* medida por resonancia de plasmones superficiales.

anticuerpo (SEQ ID NO de HC; SEQ ID NO de LC)	analito							
	E-selectina humana				E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>			
	ka	Kd	$t_{1/2}$	K_D	ka	kd	$t_{1/2}$	K_D
	(1/Ms)	(1/s)	(s)	(nM)	(1/Ms)	(1/s)	(s)	(nM)
1282 (43;1)	2,01E+05	1,41E-02	49,3	70,3	2,27E+05	1,76E-02	39,4	78,3
1284 (40;1)	2,22E+05	1,45E-02	48	65,2	2,36E+05	1,80E-02	38,5	76,5
1444 (13;1)	2,64E+05	1,63E-02	42,7	61,8	2,11E+05	1,71E-02	40,5	81,5
1448 (37;1)	2,10E+05	1,26E-02	55	60,5	2,22E+05	1,50E-02	46,2	67,8

Ejemplo 21: Fijación a superficie celular (FACS) y neutralización de anticuerpos anti-E-selectina optimizados (0164, 0841, 1282, 1284, 1444 y 1448).

Fijación a la superficie celular mediante FACS

[00504] La fijación de anticuerpos 0841, 0164, 1282, 1284, 1444 y 1448 a la E-selectina fijada a la membrana se analizó mediante FACS. Las células CHO con expresión de E-selectina humana se cultivaron en medio Alpha (MEM [Medio esencial mínimo]) Alpha Medium, 50-012-PC, Corning) complementado con suero fetal bovino dializado (GIBCO), a una concentración final de 10 % y penicilina/estreptomicina (1X) y complementado con metotrexato. Brevemente, las células descongeladas se cultivaron inicialmente en presencia de metotrexato 100 nM. Para cultivos posteriores, el metotrexato se omitió del medio de crecimiento.

[00505] Las células endoteliales se descongelaron a partir de reservas congeladas y en principio se colocaron en placas en matraces T-25 (Corning, 353108) recubiertos con 0,1 % de solución estéril de gelatina (Sigma, ES-006-B). Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se cultivaron en un medio de crecimiento de células endoteliales (Sigma Aldrich, 211-500), mientras que las células endoteliales microvasculares de pulmón de *Macaca fascicularis* (CLMEC) se cultivaron en medio de células endoteliales de mono completo (Cell Biologics, MK1168). Las células se dividieron al alcanzar 90 % de confluencia y se colocaron en placas en tres

matraces T-175 cubiertos previamente con 0,1 % de gelatina.

[00506] Las líneas celulares CHO con expresión de E-selectina humana se desprendieron de los matraces confluentes mediante el uso de amortiguador de disociación celular libre de enzimas (GIBCO, 13151014). El medio de crecimiento se agregó inmediatamente a las células separadas, luego se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para peletizar las células. Las células se volvieron a suspender en amortiguador CHO frío que consistía en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), pH 7,4, que contenía albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich, A3059) a una concentración final de 1 %, cloruro de calcio a una concentración final de 1 mM, y azida de sodio a una concentración final de 0,1 %.

[00507] Para las células primarias, HUVEC o CLMEC, los cultivos a 90 % de confluencia se sometieron a inanición sérica al reemplazar el medio de crecimiento con medio basal de células endoteliales (Sigma-Aldrich, 210-500). Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora humidificada durante 2 horas. Inmediatamente después de la inanición sérica, se agregó medio basal de células endoteliales que contenía 10 ng/ml de factor de necrosis de tejido alfa (TNF- α ; GIBCO) humano a las células para inducir la expresión de E-selectina. Luego de 4 horas de estimulación con TNF- α , las células se desprendieron mediante el uso de solución salina cítrica (cloruro de potasio 135 mM, citrato de sodio 15 mM) y se recalcificaron de inmediato mediante la adición de cloruro de calcio hasta una concentración final de 1 mM. Las células se centrifugaron a 300 x g a 4 °C y se fijaron mediante resuspensión en PBS que contenía 4 % de paraformaldehído (PFA; Electron Microscopy Sciences, 15710) en hielo húmedo durante 15 minutos. El PFA se eliminó mediante centrifugación y las células se volvieron a suspender en amortiguador CHO durante la noche.

[00508] Los estudios de fijación con células CHO se llevaron a cabo en duplicado mediante el uso de dos filas de placas de fondo redondo de 96 cavidades, mientras que los estudios de fijación con células endoteliales primarias se llevaron a cabo en una sola fila de placas con fondo en V de 96 cavidades. Las placas se centrifugaron a 300 x g durante 2 minutos a 4 °C y las células se volvieron a suspender y se bloquearon mediante incubación en el amortiguador CHO durante 10 minutos sobre hielo húmedo. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 300 x g durante 2 minutos a 4 °C para eliminar el amortiguador. El pélet celular en cada cavidad se volvió a suspender y se incubó en el volumen designado de anticuerpo diluido en serie (control IgG1 humano, 0841, 1282, 1284, 1444 y 1448) y se

permitió que se incubara durante 30 minutos sobre hielo húmedo. Las soluciones de anticuerpo de prueba se prepararon mediante una serie de dilución triple (1333 nM a 0,0226 nM) con amortiguador CHO como diluyente. Después de la incubación con el anticuerpo, las células se lavaron tres veces mediante centrifugación a 300 x g durante 1 minuto a 4 °C y se volvieron a suspender en amortiguador CHO frío. Las células lavadas se volvieron a suspender y se incubaron con 100 µl de dilución 1:1000 de fragmento anti-F(ab')₂ humano de cabra conjugado con AlexaFluor647 (anticuerpo específico del fragmento Fcγ, [Jackson ImmunoResearch, 109-606-170] durante 45 minutos (células CHO) o 30 minutos (células endoteliales) sobre hielo mojado. Las células se lavaron tres o cuatro veces antes de la resuspensión en amortiguador CHO para análisis de citometría de flujo. Se utilizó un instrumento Becton Dickinson LSRFortessa que utiliza una línea láser de 640 nanómetros para adquirir datos de fluorescencia celular. La fluorescencia de la media geométrica de las células se analizó mediante el paquete de *software* FlowJo (FlowJo, LLC) y se representó frente a la concentración de anticuerpos. Los valores estimados de EC₅₀ se calcularon mediante el uso de un análisis de regresión no lineal en el paquete de *software* Prism (GraphPad, versión 8).

[00509] Los anticuerpos 0841, 1282, 1284, 1444 y 1448 se fijaron a células CHO modificadas por ingeniería genética para expresar E-selectina humana con valores estimados de EC₅₀ similares en un rango de por debajo de nM a nM bajo (Tabla 27). La IgG humana de control no exhibió fijación alguna a las células CHO con expresión de E-selectina humana.

[00510] Los anticuerpos 0164, 1282, 1284, 1444 y 1448 se fijaron a E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* de la superficie celular en HUVEC y CLMEC que se trataron durante 4 horas con TNF-α para inducir la expresión de E-selectina. En comparación con el control de isotipo IgG1, en el cual no se detectó fijación, se observó fijación a E-selectina expresada de manera endógena en la superficie celular de HUVEC o CLMEC activada con TNF-α. Se observó un fondo con alta fluorescencia y no se calcularon los valores EC₅₀ (Tabla 27).

[00511] **Tabla 27.** Fijación de anticuerpo a la superficie celular mediante FACS

anticuerpo	EC ₅₀ (nM) de fijación a células CHO-E-selectina humana	fijación a células HUVEC activadas	fijación a células CLMEC activadas
0164	NT	fijación	fijación
0841	0,71	NT	NT
1282	0,85	fijación	fijación
1284	0,64	fijación	fijación

1444	0,66	fijación	fijación
1448	0,75	fijación	fijación

Ejemplo 22: Neutralización estática de la adhesión celular mediante anticuerpos anti-E-selectina optimizados

[00512] La E-selectina se fija a ligandos modificados con Lewis sialilados expresados en las superficies de glóbulos rojos. En este estudio, la línea celular promielocítica humana (HL-60) se utilizó como una fuente celular para ligandos de E-selectina. Se evaluó la actividad neutralizante de anticuerpos 0164, 1282, 1284, 1444 y 1448 sobre la adhesión de células HL-60 a E-selectina de superficie celular (en células CHO) en un ensayo de neutralización estática de adhesión.

[00513] Las células CHO que expresan E-selectina humana se cultivaron en medio de crecimiento fresco complementado con metotrexato 100 nM. Luego de este pase inicial de células, el metotrexato se omitió del medio de crecimiento de los cultivos posteriores. Se cultivaron células CHO con expresión de E-selectina de *Macaca fascicularis* en medio R1. Luego de este pase inicial de células, la zeocina se omitió del medio de crecimiento de los cultivos posteriores.

[00514] Las células HL-60 en fase logarítmica se etiquetaron con kit de etiquetado con colorante fluorescente de éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (ThermoFisher, 65-0850-84). Las células HL-60 etiquetadas se volvieron a suspender en amortiguador CHO (PBS, pH 7,4/1 % de albúmina de suero bovino (BSA)/cloruro de calcio 1 mM (CaCl₂)/0,1 % de azida de sodio (NaN₃)) a una densidad de 400.000 células/ml para uso en los ensayos de adhesión estática.

[00515] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos 0164, 1282, 1284, 1444 y 1448 para inhibir la adhesión celular de células HL-60 a células CHO que expresan E-selectina en condiciones estáticas. Brevemente, las células CHO se sembraron en dos filas de placas negras de fondo plano de 96 cavidades (réplicas técnicas) a una densidad de 100.000 células/cavidad y se permitió que formaran una monocapa confluyente (después de 24 horas por lo general) a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora humidificada. La monocapa celular se lavó suavemente con amortiguador CHO y luego las cavidades designadas se incubaron con solución de anticuerpo (0164, 1282, 1284, 1444 y 1448) en una serie de dilución triple (de 200 µg/ml o 1333 nM a 0,003 µg/ml o 0,022 nM). Un volumen apropiado de la suspensión de células HL-60 etiquetada con CFSE (400.000 células/ml) se agregó inmediatamente a las cavidades para mantener la concentración de anticuerpo final

(de 200 µg/ml o 1333 nM a 0,003 µg/ml o 0,022 nM). Las células HL-60 etiquetadas se incubaron con la monocapa de células CHO durante 45 minutos a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de aire en una incubadora humidificada. Luego de la incubación, la placa se lavó tres veces con amortiguador CHO y se midió la fluorescencia de las células HL-60 fijadas a longitudes de onda de excitación/emisión de 494/521 nanómetros con Spectramax i3X (Molecular Devices). Las unidades de fluorescencia se graficaron como una función de la concentración de anticuerpo y la IC₅₀ se estimó mediante análisis de regresión no lineal con el *software* GraphPad Prism (versión 8.0.2).

[00516] Los valores estimados de IC₅₀ para los anticuerpos fueron similares y variaron de 3,4 nM a 6,2 nM (**Figura 7**) (Tabla 28).

[00517] **Tabla 28.** Neutralización estática de adhesión de células HL-60.

neutralización estática de adhesión de células HL-60	
anticuerpo	Células CHO-E-selectina humana - IC₅₀ (nM)
0164	4,4
1282	3,4
1284	4,4
1444	4,7
1448	6,2

[00518] En otro ensayo de neutralización estática, con métodos similares a los descritos anteriormente, el anticuerpo 1444 neutralizó la adhesión de HL-60 a E-selectina tanto humana como de *Macaca fascicularis* de superficie celular con valores estimados de IC₅₀ de 3,36 nM y 3,84 nM, respectivamente (Tabla 38).

Ejemplo 23: Fijación a E-selectina humana endógena de anticuerpos anti-E-selectina optimizados

[00519] Se realizó un análisis de inhibición de fijación a E-selectina en plasma humano por parte de anticuerpos anti-E-selectina optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448 con el método IP-LC/MS/MS. Este método cuantificó la E-selectina humana soluble libre en suero humano o E-selectina de mono soluble libre en suero de *Macaca fascicularis*. El método utilizó 50 µl de suero en 250 µl de PBS que se incubó durante la noche a 4 °C (en una habitación fría, agitación a 500 rpm) con 1,0 µg de anticuerpo anti-E-selectina biotilado 0164. Luego de la incubación, se agregaron 30 µl de microesferas magnéticas de estreptavidina T1 de Invitrogen a cada muestra, seguido de incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente (agitación a 1000 rpm). Con un Hamilton Microlabstar, las microesferas magnéticas se lavaron luego dos veces con PBS/0,05 % de Tween-20, seguido de un lavado con PBS. La E-selectina soluble se

eluyó luego de las microesferas con 145 μ l de ácido clorhídrico (HCl) 30 mM y se neutralizó con 32 μ l de Tris HCl 1 M, pH 8. Posteriormente, se agregaron 50 fmol de estándar interno etiquetado con isótopos estables (SIL), seguido de la adición de ditioneitol (DTT, 10 μ l x 50 mM). Luego de la incubación durante 35 minutos a 60 °C, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de la adición de yodoacetamida (IAA, 10 μ l x 100 mM). Luego, las muestras se dejaron a oscuras durante 30 minutos, se les agregó 1 μ g de LysC/tripsina de Promega (10 μ l x 100 μ g/ml), y luego se digirieron durante la noche a 37 °C.

[00520] Luego de la incubación durante la noche, se inyectaron 50 μ l de muestra preparada en el nano ESILC-MS/MS. La cuantificación se produjo al monitorear los péptidos tripticos para determinar la presencia de E-selectina soluble (CSSLAVLEK (SEQ ID NO: 193)). Esta cuantificación mostró que los anticuerpos 1282, 1284, 1444 y 1448 tenían una inhibición similar de E-selectina humana con IC₅₀ de 2,4 nM, 1,1 nM, 1,2 nM y 1,8 nM, respectivamente, e IC₉₀ de 4,9 nM, 4,8 nM, 6,5 nM y 8,6 nM, respectivamente.

Ejemplo 24: Caracterización biofísica de anti-E-selectina humanizada.

Estabilidad térmica

[00521] Se utilizó calorimetría diferencial de barrido para determinar la estabilidad de los cuatro anticuerpos anti-E-selectina optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448. Se utilizó el método DSC similar al método descrito en el Ejemplo 16. La Tabla 29 a continuación muestra las temperaturas de fusión (T_{m1} – T_{m3} y FAB) de estas moléculas en amortiguador de Tris/Sacarosa ("Tris/Suc") (Tris 20 mM, 8,5 % de sacarosa, a pH 7,5), amortiguador de Histidina/Sacarosa ("His/Suc") (histidina 20 mM, 8,5 % de sacarosa, 0,005 % de EDTA, a pH 5,8) y amortiguador de ácido glutámico/Trehalosa ("Glu/Tre") (ácido glutámico 20 mM, 8,5 % de trehalosa, a pH 4,5). Las cuatro moléculas demostraron buena estabilidad, en donde la primera transición en el dominio CH2 (T_{m1}) fue mayor de 65 °C en los amortiguadores Tris/Suc, His/Suc y Glu/Tre. Estas moléculas mostraron un leve aumento de la estabilidad en los amortiguadores His/Suc y Glu/Tre, y una leve disminución de la estabilidad en el amortiguador Tris/Suc.

[00522] **Tabla 29.** Estabilidad térmica de anticuerpos anti-E-selectina optimizados determinada mediante calorimetría diferencial de barrido.

anticuerpo	formulación	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Tm aparente de Fab(°C)
1282	Tris/Suc, pH 7,5	71,41 ± 0,01	77,23 ± 0,04	85,86 ± 0,02	71,7
	His/Suc/EDTA, pH 5,8	71,70 ± 0,02	77,64 ± 0,05	84,42 ± 0,01	72,0
	Glu/Tre, pH 4,5	65,99 ± 0,02	74,81 ± 0,01	82,99 ± 0,02	74,9
1284	Tris/Suc, pH 7,5	71,56 ± 0,01	78,12 ± 0,02	85,52 ± 0,02	71,7
	His/Suc/EDTA, pH 5,8	71,52 ± 0,06	76,09 ± 0,16	84,23 ± 0,02	73,0
	Glu/Tre, pH 4,5	65,95 ± 0,02	75,42 ± 0,01	83,07 ± 0,02	75,5
1444	Tris/Suc, pH 7,5	71,25 ± 0,01	77,78 ± 0,02	85,47 ± 0,02	71,4
	His/Suc/EDTA, pH 5,8	71,69 ± 0,01	78,17 ± 0,02	84,34 ± 0,01	71,8
	Glu/Tre, pH 4,5	65,79 ± 0,01	74,28 ± 0,01	82,88 ± 0,02	74,3
1448	Tris/Suc, pH 7,5	72,06 ± 0,01	77,70 ± 0,02	85,47 ± 0,01	72,2
	His/Suc/EDTA, pH 5,8	73,10 ± 0,10	76,24 ± 1,54	84,34 ± 0,02	73,5
	Glu/Tre, pH 4,5	65,65 ± 0,01	74,62 ± 0,03	76,58 ± 0,02	75,2

Degradación forzada

[00523] Se prepararon anticuerpos anti-E-selectina optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448 para el estudio de degradación forzada de 4 semanas a 40 °C mediante diálisis exhaustiva en tres amortiguadores: Tris (Tris 20 mM a pH 7,5), His (histidina 20 mM a pH 5,8) y Glu (ácido glutámico 20 mM a pH 4,5). Después de la diálisis, las concentraciones de la muestra se ajustaron a 5 mg/ml. En las semanas T0, T2 y T4, las muestras se dividieron en alícuotas para aSEC, iCE y pruebas de bioensayo.

[00524] El estado de agregación de las muestras de degradación forzada se determinó mediante aSEC como se describe en el Ejemplo 16. Todas las muestras mostraron cambios mínimos, menos de 5 % de LMMS y menos de 1 % de especies de HMMS en las semanas T4 (Tabla 30).

[00525] **Tabla 30.** aSEC de muestras de degradación forzada de anticuerpos anti-E-selectina optimizados.

	anticuerpo 1282		
Semana 4, 40 °C	% de HMMS	% de principales	% de LMMS
Tris (pH 7,5)	0,38	97,18	2,43
His (pH 5,8)	0,33	97,44	2,23
Glu (pH 4,5)	0,47	95,91	3,62
	anticuerpo 1284		
Semana 4, 40 °C	% de HMMS	% de principales	% de LMMS
Tris (pH 7,5)	0,62	96,38	3,00
His (pH 5,8)	0,34	97,51	2,15
Glu (pH 4,5)	0,51	95,65	3,84
	anticuerpo 1444		
Semana 4, 40 °C	% de HMMS	% de principales	% de LMMS
Tris (pH 7,5)	0,56	95,55	3,89
His (pH 5,8)	0,31	97,70	2,00
Glu (pH 4,5)	0,59	95,63	3,78
	anticuerpo 1448		
Semana 4, 40 °C	% de HMMS	% de principales	% de LMMS
Tris (pH 7,5)	0,68	94,96	4,36
His (pH 5,8)	0,33	97,56	2,11
Glu (pH 4,5)	0,61	95,68	3,72

[00526] Se utilizó enfoque isoeléctrico capilar en imágenes (iCE) para detectar la heterogeneidad a base de carga de las muestras de degradación forzada. Esto se llevó a cabo con un método similar al método utilizado en el Ejemplo 16. Para las muestras con un alto % de especies ácidas/básicas en el análisis iCE, se requirió un análisis de espectroscopía de masas adicional para identificar los riesgos de secuencia en las regiones CDR. El análisis de las muestras en los amortiguadores Tris, His y Glu mostró aumentos típicos en especies ácidas y básicas (Tabla 31). El anticuerpo 1444 se analizó además mediante análisis de tres partes de espectrometría de masas y mapeo de péptidos para su comparación con el 0841 humanizado.

[00527] **Tabla 31.** Análisis iCE de muestras de degradación forzada de anticuerpos anti-E-selectina optimizados.

anticuerpo 1282	40 °C	iCE pI	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris, pH 7,5	T0W	7,66	19,7	75,4	5,0
	T2W	7,66	38,8	48,4	12,8
	T4W	7,66	45,6	38,5	15,9
His, pH 5,8	T0W	7,74	18,2	77,7	4,1
	T2W	7,73	25,9	65,2	8,9
	T4W	7,74	33,7	55,9	10,4

Glu, pH 4,5	T0W	7,67	20,2	74,5	5,3
	T2W	7,67	31,5	55,5	13,0
	T4W	7,66	40,6	42,8	16,6
anticuerpo 1284	40 °C	iCE pl	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris, pH 7,5	T0W	7,66	22,3	73,4	4,4
	T2W	7,66	36,3	51,7	12,0
	T4W	7,66	49,2	36,0	14,8
His, pH 5,8	T0W	7,74	19,5	76,8	3,7
	T2W	7,75	27,5	65,6	6,9
	T4W	7,74	35,6	55,7	8,8
Glu, pH 4,5	T0W	7,67	21,1	74,3	4,6
	T2W	7,67	32,1	56,6	11,4
	T4W	7,67	41,9	43,8	14,2
anticuerpo 1444	40 °C	iCE pl	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris, pH 7,5	T0W	8,02	25,1	71,3	3,6
	T2W	8,02	36,2	52,3	11,5
	T4W	8,02	51,4	34,2	14,4
His, pH 5,8	T0W	8,08	25,7	70,8	3,6
	T2W	8,08	33,2	59,7	7,1
	T4W	8,09	44,6	47,1	8,4
Glu, pH 4,5	T0W	8,03	20,7	75,8	3,6
	T2W	8,03	36,3	52,4	11,3
	T4W	8,03	44,3	40,9	14,8
anticuerpo 1448	40 °C	iCE pl	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris, pH 7,5	T0W	8,01	24,5	71,8	3,7
	T2W	8,01	39,1	50,4	10,5
	T4W	8,01	54,0	33,0	13,0
His, pH 5,8	T0W	8,07	25,6	70,7	3,8
	T2W	8,07	34,8	57,2	8,0
	T4W	8,08	40,0	51,0	9,0
Glu, pH 4,5	T0W	8,02	22,3	73,8	3,9
	T2W	8,02	31,6	54,5	13,9
	T4W	8,02	39,9	42,3	17,8

Análisis de espectrometría de masas

[00528] Se realizó un análisis de espectrometría de masas de tres partes en el anticuerpo optimizado 1444. El análisis de la degradación forzada del anticuerpo 1444 en T4W en amortiguadores Glu, His y Tris mostró perfiles similares en comparación con T0. Se observaron niveles bajos de scFc (Fc monocatenaria) oxidación y D/P Clip, se detectaron niveles bajos de oxi_Fd (Fd oxidizado), se detectaron cantidades mínimas de Fd+ HexNAc (Fd glicado), se detectaron cantidades mínimas de Fd D/P clip (fragmento Fd con sitio D/P escindido), y se observó nivel bajo de PyroE Fd (fragmento Fd con ácido piroglutámico en el terminal N) en muestras sometidas a

estrés (**Figura 8**).

[00529] Se llevó a cabo un mapeo de péptidos para el anticuerpo 1444 con un método similar al método utilizado en el Ejemplo 16. El análisis de mapeo de péptidos de alta fidelidad de las semanas T0 y T4 de las muestras de degradación forzada en amortiguador Tris, His o Glu indicó que solo se detectó un nivel mínimo de isomerización y desamidación en el péptido CDR 2 de HC del anticuerpo anti-E-selectina 1444 IDPANGNTIYVDSVTGR (SEQ ID NO: 194), (Tabla 32). Todas las muestras tuvieron >96 % de péptido regular con menos de 1 % como péptido desamidado y menos de 2 % como péptido que contiene isomerización (IsoD). Esta variante optimizada ya no contiene un motivo químicamente lábil en la posición 30 de la cadena liviana que ha mutado a Glu. Para el péptido CDR1 de LC TSQNIERYLNWYQQKPGK (SEQ ID NO: 195), no se detectó modificación alguna.

[00530] **Tabla 32.** Mapeo de péptidos LC/MS de muestras de degradación forzada de péptido CDR2 de HC a partir de anticuerpo anti-E-selectina optimizado 1444.

Péptido de CDR2 de HC	% de péptido regular	% de péptido de desamidación	% de péptido IsoD
T0	99,00 %	0,07 %	0,32 %
Glu T4W	98,30 %	0,18 %	0,56 %
His T4W	96,60 %	0,16 %	0,65 %
Tris T4W	97,80 %	0,30 %	1,20 %

[00531] Para evaluar adicionalmente la estabilidad de las muestras de degradación forzada, se evaluó la actividad de las muestras sometidas a estrés (anticuerpos 1282, 1284, 1444, 1448) en un ELISA de fijación competitiva. Aquí se compararon las muestras T0, T2W y T4W en cuanto a su capacidad para competir con el anticuerpo quimérico biotinilado 0164 por la fijación a E-selectina humana. Este método fue similar al método descrito en el Ejemplo 16. Los resultados de fijación competitiva se muestran en las **Figuras 9A-9D** y no se observó diferencia entre las muestras T0, T2W y T4W, lo que indica que la capacidad de los anticuerpos para fijarse a E-selectina fue estable luego de la incubación a alta temperatura.

Estabilidad de concentración alta

[00532] Los anticuerpos anti-E-selectina optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448 se dializaron ampliamente en tres amortiguadores, Tris/Suc (Tris 20 mM, 8,5 % de sacarosa, a pH 7,5), His/Suc (histidina 20 mM, 8,5 % de sacarosa, 0,005 % EDTA, a pH 5,8) y Glu/Tre (ácido glutámico 20 mM, 8,5 % de trehalosa, a pH 4,5). Luego de la diálisis, las muestras se concentraron hasta 150 mg/ml mediante una concentradora

de filtro rotativo y se almacenaron a 4 °C y 25 °C. Al momento cero (T0), una semana (T1W), dos semanas (T2W), cuatro semanas (T4W), seis semanas (T6W) y siete semanas (T7W), las muestras se dividieron en alícuotas para análisis aSEC en tiempo real, y se llevó a cabo análisis iCE y CGE en las semanas T0, T3 y T7 al finalizar el estudio.

[00533] El estado de agregación de las muestras de concentración alta se determinó mediante aSEC como se describe en el Ejemplo 16. Las muestras a 4 °C y 25 °C mostraron buena estabilidad de concentración alta en todos los puntos temporales con un aumento mínimo en HMMS (<5 % del total) en las tres condiciones de amortiguador (**Figura 10A-10D**).

[00534] Se utilizó iCE para detectar la heterogeneidad a base de carga de las muestras de concentración alta mediante un método similar al método descrito en el Ejemplo 16. Se observó un cambio mínimo en el % de especies ácidas y el % de especies básicas en los anticuerpos almacenados a 25 °C en amortiguadores Tris/Suc, His/Suc y Glu/Tre durante el estudio de 7 semanas (Tabla 33).

[00535] **Tabla 33.** Análisis iCE de muestras de concentración alta a 25 °C de anticuerpos anti-E-selectina optimizados.

anticuerpo 1282			
amortiguador/tiempo	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris/Suc T0	17,7	77,5	4,8
Tris/Suc T3W	25,1	67,0	7,9
Tris/Suc T7W	35,1	54,1	10,8
His/Suc T0	13,2	82,7	4,1
His/Suc T3W	15,4	79,1	5,5
His/Suc T7W	18,3	75,6	6,1
Glu/Tre T0	16,9	77,3	5,8
Glu/Tre T3W	18,1	74,6	7,3
Glu/Tre T7W	21,1	69,5	9,5
anticuerpo 1284			
amortiguador/tiempo	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris/Suc T0	22,4	73,2	4,4
Tris/Suc T3W	29,6	63,3	7,1
Tris/Suc T7W	37,2	53,4	9,4
His/Suc T0	16,5	79,8	3,7
His/Suc T3W	19,3	76,1	4,6
His/Suc T7W	22,4	71,9	5,7
Glu/Tre T0	18,6	77,0	4,5
Glu/Tre T3W	20,0	73,7	6,2
Glu/Tre T7W	22,7	69,9	7,4
anticuerpo 1444			
amortiguador/tiempo	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris/Suc T0	24,0	72,4	3,6
Tris/Suc T3W	31,9	61,0	7,1
Tris/Suc T7W	39,2	51,1	9,8
His/Suc T0	24,7	71,1	4,3
His/Suc T3W	24,4	70,9	4,7
His/Suc T7W	29,5	64,1	6,5
Glu/Tre T0	24,0	72,4	3,6
Glu/Tre T3W	26,7	67,0	6,4
Glu/Tre T7W	29,7	63,0	7,3
anticuerpo 1448			
amortiguador/tiempo	% de especies ácidas	% de principales	% de especies básicas
Tris/Suc T0	30,4	65,3	4,4
Tris/Suc T3W	35,1	58,6	6,3
Tris/Suc T7W	43,3	48,0	8,7
His/Suc T0	28,1	67,5	4,4
His/Suc T3W	30,7	63,5	5,8
His/Suc T7W	32,4	61,2	6,3
Glu/Tre T0	27,9	68,4	3,8
Glu/Tre T3W	29,2	63,9	6,9
Glu/Tre T7W	32,8	57,9	9,2

[00536] Se llevó a cabo un análisis CGE para determinar la fragmentación de las muestras de concentración alta de anticuerpos optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448. El análisis se llevó a cabo mediante un método similar al método descrito en el Ejemplo 16. La cuantificación del % de fragmentación y el % de HMMS demostró una buena estabilidad de concentración alta para los anticuerpos 1282, 1284, 1444 y 1448 en los tres amortiguadores a 25 °C (Tabla 34).

[00537] **Tabla 34.** Análisis CGE de muestras de concentración alta a 25 °C de anticuerpos anti-E-selectina optimizados.

anticuerpo 1282 amortiguador/ tiempo	suma de % de HLC	% de no HLC	% de no HLC	
			% de fragmento (LMMS)	% de otro (HMMS)
Tris/Suc, T0	99,89	0,11	0,07	0,04
Tris/Suc, T3W	99,88	0,12	0,05	0,07
Tris/Suc, T7W	99,86	0,14	0,07	0,07
His/Suc, T0	99,92	0,08	0,04	0,04
His/Suc, T3W	99,95	0,05	0,04	0,01
His/Suc, T7W	99,90	0,10	0,07	0,03
Glu/Tre, T0	99,96	0,04	0,00	0,04
Glu/Tre, T3W	99,84	0,16	0,11	0,05
Glu/Tre, T7W	99,77	0,23	0,20	0,03

anticuerpo 1284 amortiguador/ tiempo	suma de % de HLC	% de no HLC	% de no HLC	
			% de fragmento (LMMS)	% de otro (HMMS)
Tris/Suc, T0	99,99	0,01	0,00	0,01
Tris/Suc, T3W	99,79	0,21	0,10	0,11
Tris/Suc, T7W	99,79	0,21	0,11	0,10
His/Suc, T0	99,92	0,08	0,05	0,03
His/Suc, T3W	99,90	0,10	0,05	0,05
His/Suc, T7W	99,75	0,25	0,19	0,06
Glu/Tre, T0	99,86	0,14	0,09	0,05
Glu/Tre, T3W	99,84	0,16	0,11	0,05
Glu/Tre, T7W	99,76	0,24	0,19	0,05

anticuerpo 1444 amortiguador/ tiempo	suma de % de HLC	% de no HLC	% de no HLC	
			% de fragmento (LMMS)	% de otro (HMMS)
Tris/Suc, T0	99,68	0,32	0,19	0,13
Tris/Suc, T3W	99,79	0,21	0,07	0,14
Tris/Suc, T7W	99,03	0,97	0,66	0,31
His/Suc, T0	99,70	0,30	0,20	0,10
His/Suc, T3W	99,85	0,15	0,05	0,10
His/Suc, T7W	99,43	0,57	0,42	0,15

Glu/Tre, T0	99,76	0,24	0,12	0,12
Glu/Tre, T3W	99,57	0,43	0,32	0,11
Glu/Tre, T7W	99,31	0,69	0,59	0,10
			% de no HLC	
anticuerpo 1448 amortiguador/ tiempo	suma de % de HLC	% de no HLC	% de fragmento (LMMS)	% de otro (HMMS)
Tris/Suc, T0	99,74	0,26	0,14	0,12
Tris/Suc, T3W	99,52	0,48	0,20	0,28
Tris/Suc, T7W	99,28	0,72	0,35	0,37
His/Suc, T0	99,62	0,38	0,27	0,11
His/Suc, T3W	99,29	0,71	0,56	0,15
His/Suc, T7W	99,25	0,75	0,57	0,18
Glu/Tre, T0	99,59	0,41	0,27	0,14
Glu/Tre, T3W	99,18	0,82	0,68	0,14
Glu/Tre, T7W	99,23	0,77	0,65	0,12

Viscosidad

[00538] La viscosidad de los anticuerpos optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448 se midió mediante el siguiente método a base de microesferas DLS (dispersión de luz dinámica). Las proteínas en PBS se dializaron intensivamente contra 20 mM de histidina, 85 mg/ml de sacarosa, 0,05 mg/ml de EDTA pH 6,0 mediante el uso de dispositivos para casete de membrana de 10 K MWCO (Thermo Scientific). Se recolectaron proteínas de la diálisis y se las filtró con un filtro de jeringa de 0,2 µM. Las proteínas se concentraron usando concentradores centrífugos Vivaspín de 10 K MWCO (GE Healthcare). Las alícuotas de muestra (12 µl) se retiraron del retentato del concentrador a medida que se reducía el volumen proteico y se aumentaba la concentración proteica. Se agregaron microesferas de 300 nm (Nanosphere, Thermo Scientific) a las muestras de proteínas y blanco del amortiguador. Las microesferas se diluyeron 1:10 en histidina 20 mM, 85 mg/ml de sacarosa, 0,05 mg/ml de EDTA a pH 6,0, y se agregaron 0,75 µl de microesferas diluidas a la muestra de proteínas. Las muestras de proteína/microesfera y amortiguador/microesfera se mezclaron mediante agitación suave. Se transfirieron ocho µl de muestra a una placa de 1536 cavidades (Sensoplate, fondo de vidrio, Greiner Bio-One) para su análisis con DLS. La placa se selló con cinta ópticamente transparente y se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos para eliminar las burbujas.

[00539] Las mediciones por DLS se realizaron usando un lector de placas DynaPro (Wyatt Technology, Santa Barbara, California). Las muestras se incubaron a 25 °C y se midieron con 15 adquisiciones consecutivas de 25 segundos. Se calculó el

radio promedio de la microesfera para las adquisiciones de datos que tuvieron curvas de declive aceptables. La viscosidad se calculó en función de la ecuación de Stokes-Einstein. La viscosidad de las muestras se calculó como el radio aparente medido, dividido por el radio nominal de la microesfera multiplicado por 0,893 centipoise (cP); la viscosidad del agua a 25 °C.

[00540] La formulación de concentración alta es una propiedad deseable para anticuerpos, lo que permite dosificación mayor y menos frecuente. Los anticuerpos optimizados mostraron buenos perfiles de viscosidad donde la viscosidad no alcanzó 20 cP hasta aproximadamente 160 mg/ml. Para confirmar esta medición, se llevó a cabo una medición de viscosidad adicional en una concentración única para cada anticuerpo optimizado mediante el método Anton Paar descrito a continuación.

[00541] Las muestras de proteína se concentraron hasta una diana de 170-180 mg/ml mediante unidades de filtro centrífugas Amicon con corte de peso molecular de 50 kDa (EMD Millipore, Billerica, MA). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante análisis de 280 nm en el Sistema de longitud de trayectoria variable SoloVPE (C Technologies, Inc, Bridgewater, NJ). Las mediciones de viscosidad se llevaron a cabo con un cono y placa CP25-1 en el reómetro MCR-302 (Anton Paar USA Inc., Ashland, VA) a una velocidad de rotación constante de 150 rpm a 25 °C. Se recolectó un total de 10 mediciones de 10 segundos cada una por muestra y los datos se analizaron mediante el *software* Rheoplus (Anton Paar USA Inc.) V 3.62. La viscosidad de 1282 medida fue de 36,29 cP a 179,5 mg/ml. La viscosidad de 1284 medida fue de 27,38 cP a 171,9 mg/ml. La viscosidad de 1444 medida fue de 33,43 cP a 185,7 mg/ml. La viscosidad de 1448 medida fue de 33,35 cP a 186,8 mg/ml. Todas estas mediciones se ajustan bien al ajuste de curva de las mediciones de viscosidad DLS, lo que refuerza su precisión (**Figura 11**).

Ejemplo 25: Riesgo de inmunogenicidad *in silico* y predicción de epítipo de linfocito T de anti-E-selectina optimizada.

[00542] El riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos anti-E-selectina optimizados 1282, 1284, 1444 y 1448 se predijo mediante herramientas *in silico* para predecir la fijación del péptido MHCII. El método utilizado fue similar al método descrito en el Ejemplo 17. Los anticuerpos optimizados mostraron una puntuación de secuencia general mejorada que disminuye desde -30,34 para el anticuerpo humanizado 0841 a puntuaciones de -46,26 para el anticuerpo 1282, -46,16 para el anticuerpo 1284, -45,11 para el anticuerpo 1444 y -45,32 para el anticuerpo 1448. De manera adicional, se eliminaron de los anticuerpos optimizados 8 epítopos de linfocitos

T que no son de línea germinal previstos (Tabla 35).

[00543] **Tabla 35.** Análisis de inmunogenicidad *in silico* de anticuerpos anti-E-selectina optimizados.

anticuerpo	VH SEQ ID NO	VL SEQ ID NO	puntuación global de secuencia	epítomos			
				todos	no de línea germinal	CDR	CDR no de línea germinal
0841	25	21	-30,34	15	8	9	8
1282	45	5	-46,26	10	0	4	0
1284	42	5	-46,16	10	0	4	0
1444	11	5	-45,11	10	0	4	0
1448	39	5	-45,32	10	0	4	0

Ejemplo 26: Autointeracción y polireactividad de anticuerpos anti-E-selectina optimizados.

[00544] Los anticuerpos optimizados 1444 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 13 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1), 1282 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 43 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1), 1284 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 40 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1) y 1448 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 37 y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1) se evaluaron para determinar su fijación a ADN e insulina, y se evaluaron además para determinar la autointeracción en un ensayo AC-SINS (espectroscopía de nanopartículas de autointeracción por captura de afinidad; Liu *et al.* (2014) mAbs 6:483-92). En el ensayo AC-SINS, los mAb capturados en nanoesferas de oro inducen un cambio en la absorbancia máxima si se fijan entre sí y por lo tanto causan que las microesferas se agrupen. Se ha sugerido que las puntuaciones altas en este ensayo se correlacionan con una solubilidad baja o deficiente e interacciones de membrana no específicas (Liu *et al.*, mAbs 2014; 6:483-92). Los anticuerpos 1282, 1284, 1444 y 1448 tuvieron puntuaciones AC-SINS y ADN/insulina muy bajas, comparables a aquellas del control negativo (Tabla 36). Estos datos indican que estos anticuerpos tienen bajo riesgo de polireactividad, de manera similar al del control negativo.

[00545] **Tabla 36.** Fijación no específica y autointeracción de anticuerpos contra E-selectina.

anticuerpo	AC-SINS (longitud de onda de absorbancia máxima en relación al blanco, nm)	Fijación de ADN normalizada al blanco	Fijación de insulina normalizada al blanco
1282	1	2	1
1284	1	2	2
1444	1	3	2
1448	1	2	2
Control negativo de polireactividad	1	2	4
Control positivo de polireactividad (MJ4-2 v1.1/P33)	22	34	36

Ejemplo 27: Evaluación de reactividad cruzada de anti-E-selectina optimizada mediante el uso de resonancia de plasmones superficiales.

[00546] Se determinaron afinidades de fijación para E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* para el anticuerpo optimizado 1444 (que comprende la secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1) mediante el uso de SPR como se describe en el Ejemplo 20. Mediante el uso de un método similar con una concentración alta de analito de 405 nM, también se evaluó la afinidad de fijación de este anticuerpo a homólogos de E-selectina de rata, E-selectina de ratón, E-selectina de conejo, L-selectina humana y P-selectina humana mediante un método similar al método descrito en el Ejemplo 5. No se observó fijación a 25 °C del anticuerpo 1444 a la E-selectina de rata, E-selectina de ratón, E-selectina de conejo, L-selectina humana y P-selectina humana hasta 405 nM (**Figura 12**). El anticuerpo 1444 se fijó a E-selectina humana con una K_D de 68,35 +/- 3,18 nM y se fijó a E-selectina de *Macaca fascicularis* con una K_D de 64,9 +/- 1,13 nM.

Ejemplo 28: Análisis ELISA de fijación directa a base de placas de anticuerpos 1282, 1284, 1444 y 1448.

[00547] Se utilizaron ELISA de fijación directa para caracterizar la fijación de los anticuerpos 0841, 1282, 1284, 1444 y 1448 a diversas selectinas recombinantes solubles inmovilizadas. Se prepararon soluciones de reserva de P-, E- o L-selectina humana recombinante etiquetada con histidina (Sino Biologicals), E-selectina de ratón (Sino Biologicals), E-selectina de rata (Sino Biologicals) y E-selectina de *Macaca fascicularis* (Sino Biologicals) a una concentración final de 1 µg/ml en solución salina

amortiguada con fosfato sin calcio y magnesio. Los controles incluyeron un anticuerpo dirigido a L-selectina (BioLegend; 304811) o anticuerpo dirigido a P-selectina o IgG de control negativo. Se agregaron cien μ l por cavidad de las proteínas selectina recombinantes diluidas a una placa de 96 cavidades Ni-NTA HisSorb (Qiagen; 35061). Las placas se incubaron en una agitadora orbital a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la incubación, las placas se lavaron 3 veces con 200 μ l de amortiguador de lavado (TRIS [trisaminometano] 50 mM; cloruro de sodio 150 mM; 0,05 % de polisorbato 20, pH 7,4). Para disminuir la fijación no específica, las placas se trataron con 200 μ l de amortiguador de bloqueo (amortiguador BD OptEIA; 555213; BD Biosciences), se incubaron en una agitadora orbital durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron como se describió anteriormente. Se agregaron anticuerpos (anticuerpo de control IgG1, anticuerpos anti-E-selectina, anticuerpo anti-P-selectina o anticuerpo anti-L-selectina) a la reacción a 100 μ l por cavidad en duplicado con una serie de dilución de cuatro veces (de 133,33 nM a 0,004 nM en amortiguador BD OptEIA), se los incubó durante 1 hora en un agitador orbital y se los lavó como se describió anteriormente. Se agregaron cien μ l de anticuerpos de detección específica (descritos a continuación) y se los incubó durante 1 hora:

- se detectaron anticuerpos de control IgG1, 0841, 1282, 1284, 1444, 1448, anti-E-selectina de ratón y anti-P-selectina mediante el uso de una dilución 1 a 25000 o 1 a 50000 de Fc gamma anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Lab; 109-035-008);
- Los anticuerpos anti-L-selectina y anti-E-selectina de rata se detectaron mediante dilución 1 a 25000 de anti-IgG de ratón en cabra AffiniPure conjugado con peroxidasa (H+L); (Jackson ImmunoResearch Lab;).

[00548] Las placas se lavaron, y se agregaron 100 μ l por cavidad de sustrato Ultra TMB de 1 etapa (Thermo Scientific) y se las incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron con 100 μ l de ácido sulfúrico 2 M y se leyó la absorbancia a 450 nm (Spectramax M5e). Los datos se analizaron y graficaron con el *software* GraphPad Prism (8.0.2). Se derivaron valores estimados de concentración máxima media (EC_{50}) del análisis.

[00549] La fijación dependiente de la dosis a la L-selectina humana o P-selectina humana inmovilizada se observó con anticuerpos dirigidos a la L- o P-selectina, con valores estimados de EC_{50} de 0,362 nM y 0,081 nM, respectivamente. Por el contrario, no se observó reactividad cruzada de 0841, 1282, 1284, 1444 o 1448

con la proteína L- o P-selectina humana (**Figura 13**). Estos estudios demuestran que los anticuerpos (por ejemplo, 1444) se fijan a E-selectina de manera selectiva, sin observarse fijación a L- o P-selectina humana.

[00550] La fijación dependiente de la dosis a la E-selectina de ratón y E-selectina de rata se observó con anticuerpos anti-E-selectina de rata o ratón de control con fijación de baja a subnanomolar (0,153 nM y 0,0139 nM, respectivamente). Por el contrario, se observó fijación débil de 0841, 1282, 1284, 1444 o 1448 a E-selectina de ratón y rata, y las curvas de fijación se desplazaron a la derecha en comparación con los anticuerpos de control positivo. Las curvas de fijación indicaron una fijación más débil, no saturable o variable en comparación con los anticuerpos de control dirigidos a E-selectina de rata o ratón (Tabla 37).

[00551] **Tabla 37.** Reactividad cruzada de anticuerpo con proteínas E-selectina recombinantes solubles.

anticuerpo	E-selectina humana EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM) de E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i> (nM)	EC ₅₀ (nM) de E-selectina de ratón	E-selectina de rata EC ₅₀ (nM)
0841	0,17	0,081	Débil, no-saturable	Débil, variable
1282	NT	NT	Débil, no-saturable	Débil, variable
1284	0,10	0,082	Débil, no-saturable	Débil, variable
1444	0,12	0,093	Débil, no-saturable	Débil, variable
1448	NT	NT	Débil, no-saturable	Débil, variable
NT = no determinado				

[00552] En un ELISA de fijación directa adicional, mediante métodos similares a los descritos anteriormente, el anticuerpo 1444 se fijó a E-selectina humana recombinante soluble inmovilizada con una EC₅₀ de 0,085 y a E-selectina de *Macaca fascicularis* recombinante soluble inmovilizada con una EC₅₀ de 0,071 a 0,075 nM (Tabla 38).

Ejemplo 29: Farmacocinética de anticuerpo optimizado 1444 en mono luego de administración intravenosa o subcutánea.

[00553] Se llevó a cabo un estudio de farmacocinética de anticuerpo optimizado 1444 en *Macaca fascicularis* mediante administración intravenosa y subcutánea. La

cuantificación de las concentraciones en suero de anticuerpo 1444 (que comprende una secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO: 7 (que incluye una lisina de terminal) y una secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO: 1) se determinó mediante un inmunoensayo en la plataforma de ensayo Meso-Scale Discovery® (MSD). En el ensayo, para cuantificar el anticuerpo anti-E-selectina 1444, se fijó anti-inmunoglobulina G (IgG) humana de cabra biotinilado a una placa de reacción pequeña recubierta con estreptavidina bloqueada. El anticuerpo anti-E-selectina 1444 fue capturado por el ligando, E-selectina humana soluble recombinante. Se detectó anticuerpo anti-E-selectina 1444 fijado con un anti-IgG humana de cabra rutenilado. Las placas se leyeron en un MSD SECTOR Imager 6000, y la detección final se llevó a cabo mediante el uso de un anticuerpo anti-IgG humana de cabra etiquetado con rutenio y Tripropilamina (TPA) para producir una señal electroquimioluminiscente dentro del instrumento MSD que es representativa de la cantidad de anticuerpo anti-E-selectina 1444 fijado. La concentración de las muestras se determinó mediante interpolación de una curva estándar que se ajusta con una ecuación logística de 5 parámetros (la fórmula de ponderación para curva estándar es $1/y^2$). El rango de cuantificación en 100 % de suero fue de 40,0 ng/ml a 2560 ng/ml.

[00554] Luego de la administración intravenosa (IV) a 0,3, 0,6, 1, 3 o 10 mg/kg a dos animales, el anticuerpo 1444 exhibió una media de depuración sistémica calculada desde el momento 0 hasta la última concentración medible ($CL_{0-t\text{última}}$) de 0,39, 0,31, 0,15, 0,18 y 0,18 ml/h/kg, respectivamente, y un volumen aparente de distribución en estado estacionario ($V_{ss(0-t\text{última})}$) de 25, 22, 27, 35 y 36 ml/kg, respectivamente. El anticuerpo 1444 mostró farmacocinética dependiente de la dosis, la depuración disminuyó a medida que aumentaba la dosis, lo que indicaba una disposición de fármaco mediada por la diana. La media de semivida ($t_{1/2}$) para la administración IV a 0,3, 0,6, 1, 3 o 10 mg/kg fue de 102, 264, 188, 287 y 345 horas respectivamente.

[00555] Luego de la administración subcutánea (SC) a 1 o 3 mg/kg a dos animales, el anticuerpo 1444 tuvo una media de biodisponibilidad (%F) de 50 % luego de la administración SC a 1 mg/kg cuando se compara con la administración IV del anticuerpo a 1 mg/kg. Luego de la administración SC del anticuerpo 1444 a 3 mg/kg, el anticuerpo 1444 tuvo una media de %F de 65 % cuando se compara con la administración IV del anticuerpo 1444 a 3 mg/kg. La media de semivida ($t_{1/2}$) para la administración SC del anticuerpo 1444 a 1 y 3 mg/kg fue de 243 y 518 horas, respectivamente.

[00556] Se validó un ensayo de fijación de ligando para detectar la presencia de

anticuerpos antifármaco (ADA) en suero de *Macaca fascicularis* sobre la plataforma Meso Scale Discovery. En este método, se incluyeron controles positivos a 2 concentraciones diferentes, que consistían en un anticuerpo anti-anticuerpo 1444 monoclonal de ratón sumado a suero de *Macaca fascicularis*, y un control negativo, que consistía en suero de *Macaca fascicularis* normal agrupado, en cada placa para monitorear el rendimiento del ensayo. La incidencia general de inducción de ADA al anticuerpo 1444 fue de 0 % (0/18 animales) en todos los grupos de dosis.

Ejemplo 30: Neutralización ex vivo de adhesión celular mediante anticuerpo optimizado 1444 en ensayos de flujo fisiológico

[00557] Se realizaron experimentos de adhesión celular ex vivo dentro de canales microfluídicos recubiertos con monocapas celulares o proteínas recombinantes para evaluar la potencia y la actividad de neutralización del anticuerpo 1444 para inhibir la adhesión de células que expresan ligandos de E-selectina. La adhesión celular se analizó en condiciones de flujo fisiológico mediante el uso de un sistema BioFlux™ (S/N-008-0180-08) (Fluxion, San Francisco, CA, EE. UU.). Se realizaron ensayos de adhesión mediante el uso de proteínas E- o P-selectinas solubles purificadas recombinantes o células de ovario de hámster chino (CHO) diseñadas por ingeniería genética para expresar E-selectina (humana o de *Macaca fascicularis*) en la superficie celular. Se utilizaron células HL-60 humanas, que expresan el ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis X, neutrófilos humanos purificados, que expresan ligandos de E-selectina, o sangre obtenida de pacientes con enfermedad de células falciformes para evaluar la adhesión a las proteínas E- y P-selectinas y células CHO que expresan E-selectina.

[00558] Se utilizaron placas/cámaras BioFlux™ (Fluxion Biosciences, 48 cavidades, bajo cizallamiento, 0-20 dinas/cm²; 910-0004) en estos estudios. Las células CHO que expresan E-selectina humana (CHO-E humana, Pfizer) o E-selectina de *Macaca fascicularis* (CHO-E de *Macaca fascicularis*, Pfizer) y las células HL-60 se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad en su respectivo medio de crecimiento. En los estudios con células HL-60, o neutrófilos humanos purificados, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se tiñeron con Calcein AM (Calcein; Life Technologies™; C3099) durante 30 minutos, se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) con calcio y magnesio (Gibco; N.º de catálogo 14040-133) y se volvieron a suspender a una concentración de 3 x 10⁶ células/ml en PBS antes de la perfusión en las cámaras de flujo. Las células se mantuvieron a 37 °C antes de la perfusión y se realizaron ensayos BioFlux™ a

temperatura ambiente. Las células adherentes se visualizaron y contaron mediante el uso de un microscopio fluorescente de contraste de fase de fase invertida Nikon Eclipse Ti-S (NIS-Elements BR 3.2 de 64 bits) con aumento de 40X. Los recuentos celulares se normalizaron al control del vehículo amortiguador fosfato. Cada experimento tiene dos cavidades por condición. Los datos se graficaron y analizaron con GraphPad Prism (8.0.2). Los valores estimados de concentración inhibidora máxima media (IC_{50}) derivados del análisis se redondearon a dos dígitos significativos desde el punto decimal. Los valores estimados de IC_{50} se calcularon mediante normalización de los datos al control de vehículo (=100 %, sin inhibición).

Neutralización de adhesión celular a E-selectina recombinante

[00559] Primero, para imitar la superficie de una célula endotelial activada, las cámaras de flujo se recubrieron con cantidades iguales de proteínas recombinantes solubles E- y P-selectinas humanas. Microcanales de flujo BioFlux™ se recubrieron con 20 µg/ml cada uno de P-selectina y E-selectina humanas recombinantes solubles (Sino Biologicals) preparadas en PBS, se perfundieron a 1 dina/cm² durante 5 minutos, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron con 0,1 % de albúmina de suero bovino (BSA)/PBS durante 3-5 minutos a 1 dina/cm². Las placas se trataron con artículos de prueba que incluyen anticuerpo 1444 (concentraciones de 0,78 a 200 nM), anticuerpo de control negativo de isotipo (200 nM), anticuerpo anti-E-selectina de control positivo (200 nM) en PBS y el control de vehículo durante 1 hora a 1 dina/cm². Se perfundió una alícuota de 100 µl de células HL-60 en cada canal durante 10 minutos a un flujo de cizallamiento fisiológico de 1 dina/cm². Se perfundió PBS durante 2-3 minutos a 1 dina/cm² para eliminar las células no adherentes y se lo analizó de la manera descrita.

[00560] El anticuerpo 1444 (0,78 a 200 nM), anticuerpo de control negativo de isotipo, o vehículo se perfundió en las cámaras para inhibir la fijación a E-selectina. En estos estudios, las células HL-60, que expresan el ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis X, se hicieron fluir a 1 dina/cm. El anticuerpo 1444 redujo la adhesión celular de HL-60 a la proteína E-selectina humana soluble purificada, con un valor estimado de IC_{50} de 15,26 nM. El control negativo de isotipo no tuvo efectos en el ensayo. El anticuerpo anti-E-selectina de control positivo redujo la adhesión de HL-60 alrededor de 43 %.

[00561] En ensayos adicionales de neutralización de adhesión de flujo, con métodos similares a los descritos anteriormente, el anticuerpo 1444 neutralizó la adhesión de HL-60 a la proteína E-selectina humana recombinante con un valor

estimado de IC₅₀ de 13,28 nM – 15,94 nM (Tabla 38).

Neutralización de adhesión celular a células de ovario de hámster chino que expresan E-selectina

[00562] Placas BioFlux™ se recubrieron con 100 µg/ml de fibronectina (Advanced BioMatrix, N.º de catálogo 5050-1MG) en PBS a una velocidad de flujo de 1 dina/cm² y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepararon células de ovario de hámster chino que expresan E-selectina (CHO-E humanas o de *Macaca fascicularis*) para ensayo mediante tratamiento con una relación 1:1 de 0,05 % de tripsina-ácido etilendiamintetraacético (EDTA), (Gibco, 25300054) y StemPro Accutase (Gibco; A1110501) durante 5 minutos a 37 °C, se las neutralizó con un volumen igual de medio de crecimiento, se las recolectó, se las centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se las volvió a suspender a una concentración final de 60 x 10⁶ células/ml en su respectivo medio de crecimiento. Las placas se perfundieron dos veces con 250 µl de medio de crecimiento CHO a 1 dina/cm² durante 2-3 minutos a temperatura ambiente, se retiró todo el medio y 10-20 µl de células CHO-E (a 60 x 10⁶ células/ml) se perfundieron durante 15 segundos a 2-3 dinas/cm². Las placas se retiraron del instrumento y se incubaron a 37 °C en una incubadora de 5 % de CO₂ durante 1 hora. Se retiró el medio y se agregaron 500 µl de medio de crecimiento nuevo y las células se incubaron a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂ durante la noche. Después de la incubación, las monocapas de CHO-E se lavaron (3-4 dinas/cm²) en el instrumento BioFlux con medio de crecimiento nuevo. Las placas se trataron con artículos de prueba que incluyen anticuerpo 1444 (concentraciones de 0,78 a 200 nM), anticuerpo de control negativo de isotipo (200 nM), anticuerpo anti-E-selectina comercial de control positivo (200 nM) en PBS y control de vehículo mediante perfusión a 1 dina/cm² durante 1 hora. Se perfundió una alícuota de 100 µl de células HL-60 en cada canal durante 10 minutos a un flujo de cizallamiento fisiológico de 1 dina/cm². La PBS se perfundió durante 2-3 minutos a 1 dina/cm² para eliminar las células no adherentes y las placas se sometieron a análisis por imágenes y se analizaron como se describe.

[00563] La E-selectina se expresa en la superficie celular endotelial. Células CHO que expresan E-selectina (humana o de *Macaca fascicularis*) se unieron a la superficie de las cámaras de flujo para formar una monocapa celular. El anticuerpo 1444 se perfundió en las cámaras (0,78 a 200 nM) y las células HL-60 se perfundieron en flujo fisiológico a 1 dina/cm². Los controles negativos incluyeron anticuerpo de control negativo de isotipo y vehículo. El anticuerpo anti-E-selectina 1444 neutralizó la

adhesión celular de las células HL-60 a células CHO-E-selectina humanas con un valor estimado de IC₅₀ de 4,41 nM. Además, el valor estimado de IC₅₀ para la neutralización de HL-60 a células que expresan E-selectina de *Macaca fascicularis* fue 4,34 nM. El anticuerpo de control negativo de isotipo no neutralizó la fijación de HL-60 a células CHO que expresan E-selectina humana o de *Macaca fascicularis*. La evaluación del anticuerpo de control positivo a 200 nM redujo la adhesión de HL-60 a células que expresan E-selectina humana alrededor de 44 %.

[00564] En otros ensayos de neutralización de adhesión de flujo, que utilizan métodos similares a los descritos anteriormente, el anticuerpo 1444 neutralizó la adhesión de HL-60 a células CHO con expresión de E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* con un valor estimado de IC₅₀ de 4,25 nM – 4,56 nM y 4,32 nM – 4,35 nM, respectivamente (Tabla 38).

Neutralización de adhesión de neutrófilos purificados a células de ovario de hámster chino que expresan E-selectina

[00565] Se prepararon monocapas de células CHO humanas y de *Macaca fascicularis* en las placas Bioflux de la manera descrita. Se obtuvo sangre de cuatro donantes voluntarios sanos (Pfizer) y se agruparon 3 ml de cada uno y se purificaron los neutrófilos con el kit Miltenyi (kit de aislamiento de neutrófilos de sangre MACSxpress, humano, 130-104-434) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

[00566] Los artículos de prueba, incluso anticuerpo 1444 (concentraciones de 0,78 a 200 nM), anticuerpo de control negativo de isotipo (200 nM), anticuerpo anti-E-selectina de control positivo (200 nM) en PBS y el control de vehículo se perfundieron a 1 dina/cm² durante 1 hora. Los neutrófilos purificados se tiñeron con Calcein y se trataron con factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Biotang Inc, 50-751-5681) durante 10 minutos a 37 °C, antes del ensayo. Los neutrófilos se recolectaron, 300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se volvieron a suspender en PBS (con calcio y magnesio). Los neutrófilos se perfundieron a 1 dina/cm² durante 10 minutos. La PBS se perfundió durante 2-3 minutos a 1 dina/cm² para eliminar las células no adherentes y las placas se sometieron a análisis por imágenes y se analizaron como se describe.

[00567] Los neutrófilos expresan ligandos de E-selectina y la E-selectina media la adherencia del neutrófilo al endotelio. Se evaluó la neutralización de anticuerpo anti-E-selectina de neutrófilos humanos a monocapas CHO que expresan E-selectina (humana o de *Macaca fascicularis*) en flujo fisiológico *ex vivo*. El anticuerpo 1444, anticuerpo de control negativo de isotipo, o vehículo se perfundieron en las cámaras.

Se purificaron neutrófilos humanos a partir de 4 donantes sanos, se los agrupó y se evaluaron los neutrófilos activados con TNF- α (10 ng/ml) en el ensayo. El anticuerpo 1444 neutralizó la adhesión de neutrófilos humanos activados a células CHO-E-selectina humanas con valores estimados de IC₅₀ de 2,87 nM. La IC₅₀ estimada para la neutralización de adhesión de neutrófilos humanos activados a células CHO-E-selectina de *Macaca fascicularis* fue de 16,33 nM.

[00568] En otro ensayo de neutralización de adhesión de flujo, que utiliza métodos similares a los descritos anteriormente, el anticuerpo 1444 neutralizó la adhesión de neutrófilos humanos activados a células CHO con expresión de E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* con un valor estimado de IC₅₀ de 4,65 nM y 9,45 nM, respectivamente (Tabla 38).

Neutralización de adhesión de células sanguíneas de SCD

[00569] Una respuesta proinflamatoria en SCD es promovida por alteraciones en el glóbulo rojo falciforme y la célula endotelial activada (Manwani D y Frenette PS Blood 2013; 122(24):3892-98). La falciformación de los glóbulos rojos, la hemólisis y la disfunción de las células endoteliales conducen a inflamación y activación celular y contribuyen a la patogénesis de SCD. Sangre de 2 donantes con SCD se etiquetó con Calcein y Hoechst para visualizar el rodamiento y la adhesión. Brevemente, la sangre se evaluó 24 horas luego de su llegada y se diluyó hasta un hematocrito de 15 % con amortiguador HBSS (solución salina equilibrada de Hank) que contenía cloruro de calcio 1 mM, cloruro de magnesio 1 mM, ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etansulfónico 10 mM, 0,25 % de BSA, 0,1 % de glucosa, pH 7,4. Las células sanguíneas se tiñeron con tinte Calcein y Hoechst (Thermo Scientific, número de catálogo 33342) (1:1000) durante 30 minutos a 37 °C antes del ensayo. Cada cámara de flujo se recubrió con 20 μ g/ml de proteínas E- y P-selectinas humanas recombinantes solubles (Sino Biologicals) preparadas en PBS a 1 dina/cm² durante 5 minutos, incubadas a temperatura ambiente durante 1-2 horas y lavadas con 0,1 % de BSA/PBS durante 3-5 minutos a 1 dina/cm².

[00570] Se evaluó sangre de ambos donantes para determinar la adhesión a las proteínas E- y P-selectinas humanas recombinantes. Se hicieron fluir artículos de prueba, incluso anticuerpo 1444, control de anticuerpo anti-P-selectina en PBS (0,78-200 nM), anticuerpo de control negativo de isotipo (200 nM), anticuerpo anti-E-selectina de control (200 nM) o vehículo a 1 dina/cm² durante 1 hora. Se hizo fluir sangre de SCD diluida durante 10 minutos a 0,6 dinas/cm². La PBS se perfundió durante 2-3 minutos a 1 dina/cm² para eliminar las células no adherentes y las placas

se sometieron a análisis por imágenes y se analizaron como se describe. Los valores estimados de IC₅₀ se calcularon de la manera descrita anteriormente. La IC₂₀, IC₈₀ e IC₉₀ estimadas se calcularon en función de la fórmula: $(IC_{50} \cdot \text{efecto}) / (100 - \text{efecto})$. El cálculo se basa en un modelo T E_{máx} $[E = (E_{máx} + C) / (C + EC_{50})]$.

[00571] El anticuerpo de control negativo de isotipo no neutralizó la fijación. El anticuerpo de control positivo, evaluado a 200 nM, redujo la adhesión por fijación celular 10-35 %. El anticuerpo 1444 neutralizó la fijación de células humanas de SCD a la E-selectina recombinante con un valor estimado de IC₅₀ de 6,17 nM y 18,66 nM, con una media de 12,4 nM (**Figura 14**). Los valores de IC₂₀, IC₈₀ e IC₉₀ se estimaron en 3,1 nM, 49,6 nM y 111,6 nM, respectivamente. Se observó una neutralización mayor de adhesión celular con la inhibición de E-selectina en comparación con la inhibición de P-selectina en condiciones de flujo fisiológico similares mediante el uso de cámaras recubiertas con las proteínas E- y P-selectinas solubles.

[00572] **Tabla 38.** Resumen de propiedades farmacológicas clave del anticuerpo 1444.

ensayo	actividad farmacodinámica
Ensayos <i>in vitro</i>	
Fijación SPR a proteína recombinante soluble	
E-selectina humana	K _D = 68,4 +/- 3,18 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	K _D = 64,9 +/- 1,13 nM
E-selectina de ratón	sin fijación (hasta 405 nM)
E-selectina de rata	sin fijación
E-selectina de conejo	sin fijación
Fijación ELISA de fijación directa a proteína recombinante soluble	
E-selectina humana	EC ₅₀ = 0,085 nM – 0,12 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	EC ₅₀ = 0,071 nM – 0,093 nM
P-selectina humana	sin fijación
L-selectina humana	sin fijación
E-selectina de ratón	fijación no saturable débil (hasta 133,3 nM)
E-selectina de rata	fijación no saturable débil (hasta 133,3 nM)
Fijación FACS a E-selectina expresada en la superficie celular	
Células CHO	
E-selectina humana	EC ₅₀ = 0,66 nM – 2,33 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	EC ₅₀ = 0,75 nM – 1,37 nM
Células primarias – TNFα activado	
Humana – HUVECS	fijación
<i>Macaca fascicularis</i> – CLMEC	fijación
Selectividad	
Células de P-selectina humana CHO	sin fijación
CHO DUKX parental	sin fijación
Ensayo funcional	
Neutralización de fijación al ligando (sialil Lewis A)	

células CHO	
E-selectina humana	IC ₅₀ = 1,88 nM – 2,89 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	IC ₅₀ = 1,47 nM – 2,65 nM
Proteína recombinante soluble	
E-selectina humana	IC ₅₀ = 2,87 nM – 3,01 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	IC ₅₀ = 2,39 nM – 2,91 nM
Neutralización de adhesión estática de células HL-60 (ligando endógeno)	
Células CHO	
E-selectina humana	IC ₅₀ = 3,36 nM – 4,7 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	IC ₅₀ = 3,84 nM
Neutralización de adhesión de flujo de células HL-60 (ligando endógeno)	
Proteína recombinante soluble	
E-selectina humana	IC ₅₀ = 13,28 nM – 15,94 nM
Células CHO	
E-selectina humana	IC ₅₀ = 4,25 nM – 4,56 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	IC ₅₀ = 4,32 nM – 4,35 nM
Neutralización de neutrófilos humanos (ligando endógeno)	
Células CHO	
E-selectina humana	IC ₅₀ = 2,87 nM – 4,65 nM
E-selectina de <i>Macaca fascicularis</i>	IC ₅₀ = 9,45 nM – 16,33 nM
Neutralización de células de pacientes con SCD	
Proteína recombinante humana soluble	IC ₅₀ = 12,4 nM
	IC ₂₀ = 3,2 nM
	IC ₈₀ = 49,6 nM
	IC ₉₀ = 111,6 nM

Ejemplo 31: Fijación a la superficie celular (FACS) y neutralización de anticuerpo anti-E-selectina optimizado 1444.

[00573] La E-selectina se expresa en la superficie de las células endoteliales y en condiciones de disfunción de las células endoteliales, tales como una respuesta inflamatoria, los glóbulos rojos en circulación se adhieren al endotelio vascular a través de interacciones entre ligando y molécula de adhesión. Se evaluó la capacidad del anticuerpo 1444 para fijarse a la E-selectina expresada en la superficie celular. En estos estudios, se usaron líneas celulares CHO que expresaban E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* fijada a la membrana para caracterizar la fijación del anticuerpo 1444 a la E-selectina expresada en la superficie celular.

[00574] Se evaluaron células CHO que expresan E-selectina (humana o de *Macaca fascicularis*) o P-selectina humana en la superficie celular y células CHO no transfectadas de control (CHO-DUKX) mediante análisis de FACS con el anticuerpo 1444, IgG1 de control de isotipo y dos anticuerpos contra P-selectina de control. El anticuerpo 1444 se fijó a la E-selectina humana con una EC₅₀ estimada de 0,66 a 2,33 nM (en función de 6 experimentos). El anticuerpo 1444 se fijó a la E-selectina de

Macaca fascicularis con una EC_{50} estimada de 0,75 a 1,37 nM (en función de 6 experimentos). El anticuerpo 1444 no se fijó a CHO-DUKX de control, lo que indica una ausencia de fijación detectable a la superficie celular. Además, el anticuerpo 1444 no se fijó a la P-selectina en la superficie celular. Se observó una fijación dependiente de la dosis del anticuerpo anti-P-selectina de control a las células CHO-P-selectina, lo que indica expresión de P-selectina. No se observó fijación con IgG1 de control de isotipo (Tabla 38).

Ejemplo 32: Estudio de tolerabilidad y toxicocinética en *Macaca fascicularis*

[00575] *Macaca fascicularis* fue la única especie no clínica farmacológicamente relevante en función de los estudios de farmacología *in vitro* diseñados para evaluar la capacidad del anticuerpo 1444 para inhibir la fijación y/o actividad biológica de E-selectina. La afinidad de fijación a E-selectina humana y de *Macaca fascicularis* fue similar en todos los ensayos evaluados, a diferencia de la falta de fijación potente a E-selectina de ratón, conejo o rata. En ensayos funcionales *in vitro*, el anticuerpo 1444 neutralizó de manera dependiente de la dosis la adhesión celular de células promielocíticas humanas a la proteína E-selectina humana recombinante soluble y E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* recombinante expresada de manera celular. Además, el anticuerpo 1444 neutralizó la adhesión de neutrófilos purificados a E-selectina celular tanto humana como de *Macaca fascicularis* con valores estimados de concentración inhibidora de 50 % (IC_{50}) en un bajo rango de nM. Una dosis SC de 30 mg/kg se asoció con una concentración máxima observada ($C_{m\acute{a}x}$) general de 353 $\mu\text{g/ml}$ y un área bajo la curva de concentración-tiempo desde el momento 0 hasta 336 horas (AUC_{336}) de 92.500 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$; mientras que la dosis IV de 100 mg/kg se asoció con una $C_{m\acute{a}x}$ general de 693 $\mu\text{g/ml}$ y un AUC_{336} de 108.000 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$. El anticuerpo 1444 se administró a *Macaca fascicularis* macho y hembra a dosis de hasta 200 mg/kg/semana IV una vez por semana durante 1 mes y se toleró bien. Los ensayos de fijación a componente 1q (C1q) del complemento humano y receptor Fc gamma de fragmento cristizable (Fc γ R) y una evaluación de reactividad cruzada de tejidos no produjeron preocupaciones de seguridad.

Ejemplo 33: Metabolismo farmacocinético y de producto en animales

[00576] Se evaluó la PK de dosis única y la TK de dosis repetidas en *Macaca fascicularis* tras la dosis IV y/o SC de anticuerpo 1444. Tras la dosis IV única en *Macaca fascicularis*, se observó una depuración (CL) dependiente de la dosis y esta fue consistente con las disposiciones de fármacos mediadas por la diana (TMDD) saturables. Después de una dosis IV única en un rango de dosis de 0,3 a 10 mg/kg, el

anticuerpo 1444 exhibió una media de CL y una media de V_{ss} de aproximadamente 0,39 a 0,15 ml/h/kg y de 22 a 36 ml/kg, respectivamente. Después de dosis SC únicas del anticuerpo 1444 a 1 mg/kg o 3 mg/kg, se observó $T_{m\acute{a}x}$ de 72 y 96 horas, respectivamente, y la biodisponibilidad de SC fue >50 %. La $T_{1/2}$ estimada del anticuerpo 1444 a 3 mg/kg IV fue de aproximadamente 12 días.

[00577] En un estudio de toxicidad de dosis repetida GLP a un mes, no hubo diferencias evidentes relacionadas con el sexo en la exposición sistémica (según lo evaluado mediante la concentración máxima observada [$C_{m\acute{a}x}$] y área bajo la curva de concentración-tiempo [AUC]) tras dosis SC e IV repetidas. La exposición sistémica aumentó al aumentar la dosis (SC) y fue mayor después de dosis SC e IV repetidas. El anticuerpo 1444 se administró a *Macaca fascicularis* macho y hembra a dosis de 15 o 50 mg/kg/semana SC o 200 mg/kg/semana IV una vez por semana durante 1 mes (5 dosis totales). Después de dosis repetidas una vez por semana a 15 y 50 mg/kg/semana, la media de $T_{m\acute{a}x}$ fue de entre 72 y 112 horas tras la dosis en los días 1 y 22. La exposición sistémica fue mayor después de dosis repetidas con una media de razones de acumulación (AUC_{168} , día 22/día 1) de 5,5, 3,2 y 1,9 para 15 (SC), 50 (SC) y 200 (IV) mg/kg/semana, respectivamente.

[00578] La dosis eficaz prevista en seres humanos es una administración SC única del anticuerpo 1444 a 150 mg. La concentración y exposición eficaces mínimas previstas a dosis SC de 150 mg son de 14 μ g/ml para la concentración promedio (C_{av} [1 a 168 horas]) y 2400 μ g·h/ml para AUC_{168} , respectivamente.

Ejemplo 34: Niveles de E-selectina, agregados y expresión de ICAM-1 en animales

[00579] La E-selectina soluble se caracterizó en suero de *Macaca fascicularis* después de dosis del anticuerpo 1444 que variaban de 0,3 a 10 mg/kg mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS). El anticuerpo 1444 mostró fijación eficaz de E-selectina dependiente de la concentración, y se observó un efecto inhibitorio de >90 % sobre E-selectina soluble en todos los grupos de dosis, lo que indicó actividad de fijación de E-selectina *in vivo* del anticuerpo 1444.

[00580] Tras la dosis de anticuerpo 1444, se recolectó sangre de *Macaca fascicularis* y se la analizó mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para detectar agregados celulares marcadores de adhesión. Se examinó el agregado de monocito-plaqueta y agregados de neutrófilo-plaqueta. En este análisis de FACS, se usó CD14 para diferenciar los monocitos y neutrófilos mediante barrido de tamaño, y se usó CD41 para detectar los agregados de monocito-plaqueta y

neutrófilo-plaqueta. El anticuerpo 1444 mostró efectos sobre la disminución en agregados de monocito-plaqueta y neutrófilo-plaqueta en *Macaca fascicularis* después del tratamiento.

[00581] Se examinó la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) de leucocitos en leucocitos de *Macaca fascicularis* después de la dosis de anticuerpo 1444 mediante análisis de FACS. Se observó una disminución de ICAM-1 tras la dosis.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende al menos uno de los siguientes:
 - (a) una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana 1 (LCDR-1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una LCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, una LCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HCDR-1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una HCDR-2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una HCDR-3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;
 - (b) una secuencia de aminoácidos de LCDR-1 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2, 18, 47, 68, 82, 97 y 106;
 - (c) una secuencia de aminoácidos de LCDR-2 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 3, 19, 48, 69, 83, 98, 107 y 120;
 - (d) una secuencia de aminoácidos de LCDR-3 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4, 20, 49, 70, 84, 99, 108 y 121;
 - (d) una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HCDR-1) seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8, 23, 52, 63, 77, 92, 111 y 125;
 - (f) una secuencia de aminoácidos de HCDR-2 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 9, 24, 29, 38, 41, 44, 53, 64, 78, 93, 112 y 126;
 - (g) una secuencia de aminoácidos de HCDR-3 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 10, 54, 65, 79, 94, 113 y 127.
 - (h) las secuencias de aminoácidos de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y las secuencias de aminoácidos de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

- (i) las secuencias de aminoácidos de LCDR-1, LCDR-2 y LCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126530, y las secuencias de aminoácidos de HCDR-1, HCDR-2 y HCDR-3 como se establecen en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126529;
- (j) un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 11, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 55, 60, 66, 75, 80, 90, 95, 104, 114, 118 y 128, y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5, 21, 27, 32, 50, 57, 71, 73, 85, 87, 100, 102, 109, 116 y 122;
- (k) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 11, y un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- (l) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
- (m) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126529, y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126530;
- (n) una cadena pesada (HC) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7, 13, 22, 28, 34, 37, 40, 43, 51, 59, 62, 74, 76, 89, 91, 103, 110, 117 y 124, y una cadena liviana (LC) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1, 17, 26, 31, 46, 56, 67, 72, 81, 86, 96, 101, 105, 115 y 119;

- (o) una HC que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13, y una LC que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1;
- (p) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 13, y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y
- (q) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126529, y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-126530.

2. Un anticuerpo aislado que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende:

una secuencia de aminoácidos que comprende una LCDR-1, una LCDR-2 y una LCDR-3 como especifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y

una secuencia de aminoácidos que comprende una HCDR-1, una HCDR-2 y una HCDR-3 como especifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

3. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende una región constante de la cadena pesada (CH) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o 16, y una región constante de la cadena liviana (CL) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

4. Un anticuerpo aislado que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende una LC que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una HC que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o 13.

5. Un anticuerpo aislado que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende al menos uno de los siguientes:

a) una región VL del anticuerpo que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

una región VH del anticuerpo que comprende la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

una región CL del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y

una región constante de la cadena pesada (CH) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o 16;

b) una región VL del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 5; y una región VH del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 11; y

c) una región LC del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1; y una HC del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 7 o 13.

6. Un anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina humana, que comprende una HC del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el inserto depositado en ATCC y que tiene el número de acceso PTA-126529, y una LC del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el inserto depositado en ATCC y que tiene el número de acceso PTA-126530.

7. El anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende un dominio Fc humano seleccionado del grupo que consiste en un dominio Fc de IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgM, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄; y/o una región constante de la cadena liviana seleccionada de kappa o lambda.

8. El anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el isotipo de cadena pesada del anticuerpo es IgG1 y/o en donde la región constante de la cadena liviana es una cadena liviana kappa.

9. El anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, anticuerpo murino, anticuerpo quimérico o anticuerpo de camélido.

10. El anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* con una K_D de alrededor de o menor que un valor seleccionado del grupo que consiste en 200 nM, 175 nM, 150 nM, 125 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM y 500

pM.

11. El anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, se fija a E-selectina humana o de *Macaca fascicularis* con una K_D de alrededor de 200 nM a alrededor de 2 nM.

12. Un anticuerpo aislado, o fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a E-selectina y muestra al menos una característica detectable seleccionada de las siguientes:

- (i) se fija a E-selectina humana con una K_D de 200 nM o menos, según se mide, opcionalmente, mediante SPR;
- (ii) se fija a E-selectina de *Macaca fascicularis* con una K_D de 200 nM o menos, según se mide, opcionalmente, mediante SPR;
- (iii) se fija con una EC_{50} de 50 nM o menos, según se mide, opcionalmente, mediante FAC, a la E-selectina expresada en la superficie celular;
- (iv) se fija con una EC_{50} de 350 nM o más, según se mide, opcionalmente, mediante FACS, a la P-selectina expresada en la superficie celular;
- (v) no se fija de manera detectable a la E-selectina de rata, ratón o conejo soluble o la L- o P-selectina humana soluble hasta 405 nM, según se mide, opcionalmente, mediante SPR;
- (vi) se fija con una EC_{50} de 2 nM o menos, según se mide, opcionalmente, mediante ELISA, a la E-selectina humana soluble;
- (vii) neutraliza la fijación con una EC_{50} de 2 nM o menos, según se mide, opcionalmente, mediante ensayo de competencia AlphaLisa, de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana soluble;
- (viii) se fija con una IC_{50} de alrededor de 1 nM a alrededor de 3 nM a la E-selectina humana soluble libre en suero humano;
- (ix) neutraliza la fijación con una IC_{50} de 100 nM o menos, según se mide, opcionalmente, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas, de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana soluble;
- (x) neutraliza la fijación con una IC_{50} de 50 nM o menos, según se mide, opcionalmente, mediante ELISA de competencia en condiciones estáticas, de un ligando sialil-Lewis A a la E-selectina humana expresada en la superficie celular;
- (xi) inhibe la adhesión con una IC_{50} de 100 nM o menos, según se mide, opcionalmente, en condiciones estáticas, de células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y

otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular;

- (xii) inhibe la adhesión con una IC_{50} de 100 nM o menos, según se mide, opcionalmente, en condiciones de flujo fisiológico, de células que expresan un ligando de E-selectina (por ejemplo, ligando de E-selectina, PSGL-1 y otros ligandos sialil-Lewis) a la E-selectina humana expresada en la superficie celular;
- (xiii) inhibe la adhesión con una IC_{50} de alrededor de 6,17 nM a alrededor de 18,66 nM, según se mide, opcionalmente, en condiciones de flujo fisiológico, de células sanguíneas de pacientes con SCD a la E-selectina humana soluble;
- (xiv) se fija a al menos un residuo de aminoácido de la E-selectina humana seleccionado de: T7, E8, A9, M10, T11, P46, S47, Y48, N82, N83, Q85, E88, E92, Y94, R97, N105, E107, R108, S110, K111, K112 y K113;
- (xv) tiene una media de semivida de alrededor de 14,4 días (345 horas) tras la administración IV a una dosis de 10 mg/kg;
- (xvi) tiene una media de semivida de alrededor de 21,5 días (518 horas) tras la administración SC a una dosis de alrededor de 3 mg/kg;
- (xvii) tiene una viscosidad de 33,4 cP a 185,7 mg/ml cuando se mide a 25 °C mediante, opcionalmente, un método Anton Parr;
- (xviii) exhibe propiedades de formulación adecuadas en el comercio, que incluyen un alto grado de estabilidad térmica y una agregación mínima a una concentración alta; y
- (xix) exhibe expresión y pureza reproducibles en condiciones de producción a gran escala.

13. Un anticuerpo aislado o fragmento de fijación al antígeno de este que compite por la fijación a la E-selectina humana con al menos un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

14. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

15. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos una de las siguientes:

- a) la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 136, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 137 o ambas;
- b) una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste

en la secuencia de SEQ ID NO: 136, 144, 146, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171 y 173 o una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 137, 145, 147, 149, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172 y 174, o ambas;

- c) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 206 o 138, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 139, o ambas; y
- d) la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126529, la secuencia de ácidos nucleicos del inserto del plásmido depositado en ATCC y que tiene el N.º de acceso PTA-126530, o ambas.

16. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14 o 15.
17. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 16.
18. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha célula huésped es una célula de mamífero seleccionada del grupo que consiste en una célula CHO, una célula COS, una célula HEK-293, una célula NS0, una célula PER.C6® o una célula Sp2.0.
19. Un método para elaborar un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 17 o 18 en una condición en donde dicho anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, es expresado por dicha célula huésped.
20. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, y un portador o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
21. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende i) un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una cadena pesada del anticuerpo codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una cadena liviana del anticuerpo codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, ii) un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que comprende una cadena pesada del anticuerpo codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena liviana del anticuerpo codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o iii) ambos.
22. Un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno médico mediado

por o asociado con la expresión de la E-selectina y/o la fijación de la E-selectina a un ligando, en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que se fija específicamente a la E-selectina.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la afección, enfermedad o trastorno médico es SCD, una enfermedad de la piel (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide) y/o complicaciones de la diabetes.

24. Un método para tratar SCD en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que se fija específicamente a la E-selectina y tratar, prevenir y/o mejorar al menos un signo y/o síntoma de SCD seleccionados del grupo que consiste en los que afectan el sistema cardiorrespiratorio (por ejemplo, enfermedad pulmonar restrictiva crónica, enfermedad diastólica del ventrículo izquierdo, hipertensión pulmonar, síndrome torácico agudo, disritmias, muerte súbita, crisis vasooclusiva (VOC)), el sistema nervioso (por ejemplo, apoplejía hemorrágica, trombosis del seno venoso, infarto cerebral silencioso, dolor crónico, apoplejía isquémica aguda del cerebro, retinopatía proliferativa, infarto orbitario, deterioro cognitivo), el sistema reticuloendotelial (por ejemplo, secuestro esplénico, hipoesplenismo funcional, anemia, hemólisis), el sistema musculoesquelético (por ejemplo, necrosis avascular, ulceraciones cutáneas), el sistema urogenital (por ejemplo, necrosis papilar, proteinuria, insuficiencia renal, hematuria, enuresis nocturna, priapismo) y el sistema gastrointestinal (por ejemplo, colelitiasis, colangiopatía, hepatopatía, vasooclusión mesentérica).

25. El método para tratar SCD de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el tratamiento de VOC incluye i) tratamiento de VOC aguda mediante la disminución de la duración y/o intensidad de la VOC, ii) prevención o reducción de los casos de VOC o iii) ambos.

26. Un método para disminuir una actividad biológica de E-selectina en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que se fija específicamente a la E-selectina.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, disminuye al menos una actividad biológica detectable de la E-selectina, en donde la actividad disminuida se selecciona del grupo que consiste en (a) unión de leucocitos a células endoteliales; (b) activación de la adhesión estable a las células endoteliales; (c) rodamiento lento de los leucocitos hasta detenerse; (d) migración transendotelial eficaz de leucocitos; (e) afinidad y aversez de la E-selectina a las integrinas CD18; (f) tráfico de leucocitos a sitios de inflamación aguda; (g) calcio citosólico; (h) fosforilación de tirosina que activa p38 MAP quinasa y Syk quinasa; (i) reclutamiento de plaquetas y leucocitos de la sangre al endotelio vascular; y (j) creación de un entorno proinflamatorio.

28. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-27, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo adicional, cuyo compuesto o modalidad adicional es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el al menos un compuesto terapéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en profilaxis de penicilina, hidroxiurea (DROXIA, HYDREA), L-glutamina (ENDARI), crizanlizumab (ADAKVEO), voxelotor (OXBRYTA), apixabán (ELIQUIS), rivaroxabán (XARELTO), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un analgésico (por ejemplo, un analgésico opioide), IW-1701, riociguat (ADEMPAS), ticagrelor (BRILINTA), memantina (NAMENDA) y una combinación de estos.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el al menos un compuesto terapéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-P-selectina, un compuesto que modula HbS para mantenerla en su estado R (es decir, oxigenado), un compuesto que modula la afinidad al oxígeno de HbS, un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al modular la generación de ácido 2,3-difosfoglicérico, un compuesto que se dirige a la polimerización de HbS al inducir la expresión de hemoglobina fetal (HbF), un compuesto que se dirige a la adhesión celular disfuncional, la disfunción vascular y/o la inflamación, un compuesto que aumenta los niveles de óxido nítrico (NO) en la sangre en comparación con el nivel de NO antes de la administración del compuesto, IG intravenosa, un compuesto que se dirige a la hipercoagulabilidad, un compuesto que bloquea la fijación al receptor NMDA y una combinación de estos.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el compuesto que

modula HbS para mantenerla en su estado R (es decir, oxigenado) se selecciona del grupo que consiste en 6-{(1S)-1-[(2-amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi]etil}-5-(1 H-pirazol-1-il)piridin-2-ol, (S)-6-(1-((2-amino-6-fluoroquinolin-3-il)oxi)etil)-5-(1 H-pirazol-1-il)piridin-2(1H)-ona y una combinación de estos.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde la al menos una modalidad de tratamiento terapéuticamente activa adicional se selecciona del grupo que consiste en suplemento de oxígeno, transfusión de sangre, opcionalmente con quelación de hierro, trasplante de médula ósea, tratamiento génico, un tratamiento de edición de genes mediante CRISPR o una técnica de dedos de zinc y una combinación de estos.

33. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-32, en donde la administración del al menos un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo adicional, que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD, es simultánea, secuencial o por separado de la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-E-selectina, o fragmento de fijación al antígeno de este.

34. Un kit para el tratamiento de SCD, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-E-selectina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

35. El kit de acuerdo con la reivindicación 34, que comprende además una cantidad sinérgica y terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto o modalidad de tratamiento terapéuticamente activo adicional que es eficaz para tratar y/o prevenir al menos un signo y/o síntoma de SCD.

36. Un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o afección asociado con, o mediado por, la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a un ligando.

37. El anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la enfermedad, trastorno o afección es SCD.

38. El uso de un anticuerpo, o fragmento de fijación al antígeno de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en la elaboración de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad, trastorno o afección asociado con, o mediado por, la expresión de E-selectina y/o la fijación de E-selectina a un

ligando.

39. El uso de acuerdo con la reivindicación 38, en donde la enfermedad, trastorno o afección es SCD.

40. El anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 para usar en la reducción de la actividad de E-selectina en un sujeto que lo necesite, para el tratamiento de SCD.

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos, que se fijan específicamente a E-selectina. La invención incluye usos y métodos asociados para usar los anticuerpos, y fragmentos de fijación al antígeno de estos.