

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 489**

51 Int. Cl.:

A61F 7/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2004 E 04761479 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 1706079**

54 Título: **Anticuerpos contra el factor VIII con glucosilación modificada en la región variable**

30 Prioridad:

14.08.2003 GB 0319118

18.08.2003 GB 0319345

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

11.07.2013

73 Titular/es:

THROMBOGENICS N.V. (100.0%)

**Gaston Geenslaan 1
3001 Heverlee, BE**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE y
JACQUEMIN, MARC**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 412 489 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el factor VIII con glucosilación modificada en la región variable

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a la modificación de anticuerpos inhibidores a fin de lograr una actividad inhibidora máxima variable, y a su aplicación en el desarrollo de agentes antitrombóticos, así como a composiciones farmacéuticas y mezclas que incluyen tales anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La formación de coágulos de sangre no sólo limita la hemorragia en caso de lesión (hemostasia) sino que puede ocluir importantes arterias o venas, conduciendo al grave daño orgánico y a la muerte. De este modo, la trombosis es la formación de coágulos de sangre en el momento y lugar equivocados.

Con el daño de un vaso, el sistema de coagulación (coagulante) se inicia inmediatamente, produciendo trombina y plaquetas sanguíneas que se adhieren a proteínas de la matriz, lo que a su vez conduce a la agregación de plaquetas adicionales en un tapón de plaquetas creciente concomitantemente con la conversión de fibrinógeno en la sangre a la fibrina insoluble.

15 En cada etapa del ciclo de coagulación, un cimógeno de un factor de coagulación sufre proteólisis limitada y se convierte él mismo en una proteasa activa. Esta enzima del factor de coagulación activa al siguiente cimógeno del factor de coagulación hasta que se forma trombina, que conecta fibrinógeno al coágulo de fibrina insoluble. Los factores de coagulación de la sangre incluyen factor I (fibrinógeno), factor II (protrombina), factor tisular (anteriormente conocido como factor III), factor IV (Ca²⁺), factor V (factores lábiles), factor VII (proconvertina), factor VIII (globulina antihemofílica, o 11AHG11), factor IX (factor de Christmas), factor X (factor de Stuart), factor XI (antecedente de la tromboplastina plasmática, o "PTA"), factor XII (factor de Hageman), factor XIII (factor estabilizante de la fibrina), y factores HMWK (quininógeno de peso molecular elevado, o factor de Fitzgerald), PREK (precalicreína, o factor de Fletcher), Ka (calicreína), y PL (fosfolípido).

25 El fibrinógeno es un sustrato para la enzima trombina (factor IIa), una proteasa que se forma durante el proceso de coagulación mediante la activación de un cimógeno circulante, la protrombina (factor II). La protrombina se convierte en la enzima activa trombina por el factor X activado, en presencia de factor V activado, Ca²⁺ y fosfolípido. Dos rutas distintas, denominadas los sistemas "intrínseco" y "extrínseco", conducen a la formación de factor X activado. En el sistema intrínseco, están presentes todos los factores proteicos necesarios para la coagulación en la sangre circulante. En el sistema extrínseco, el factor tisular, que no está presente en la sangre circulante, se expresa en endotelio dañado, por monocitos activados, por células en la placa arteriosclerótica, o por células fuera de la pared de los vasos. El factor tisular actúa entonces como el receptor y cofactor esencial para la unión del factor VII, dando como resultado una enzima bimolecular (factor tisular VIIa) para iniciar la ruta extrínseca de la coagulación. Este mecanismo también activa la ruta intrínseca de la coagulación.

35 Como resumen, el sistema de coagulación implica una cascada de reacciones bioquímicas complejas y reguladas entre proteínas sanguíneas circulantes (factores de coagulación), células de la sangre (en particular plaquetas) y elementos de una pared de vaso lesionada.

40 La enfermedad tromboembólica venosa (trombosis de venas profundas, embolia pulmonar, fibrilación ventricular) sigue siendo un problema importante de salud, con una incidencia de 1 a 3 por 1000 individuos por año, y una tasa de mortalidad prematura elevada (Nordstrom et al. (1992) J Intern Med. 232, 155-160; Rosendaal (1997) Thromb Haemost 78, 1-6).

45 Las terapias anticoagulantes actuales consisten principalmente en heparina (o heparinas de peso molecular bajo) y antagonistas de la vitamina K, que son ambos insatisfactorios e inconvenientes. Todos los tratamientos poseen un riesgo significativo de hemorragia (Res. Comm. British Thoracic Soc. (1992) Lancet. 340(8824):873-6), lo que limita tanto la dosis como la duración del tratamiento y puede requerir una monitorización habitual (Hylek y Singer (1994) Ann Intern Med. 120, 897-902; Cannegieter et al. (1995) N Engl J Med. 333, 11-17). Actualmente se están desarrollando nuevos fármacos, pero ninguno parece adecuarse a los criterios óptimos de eficacia, seguridad y conveniencia.

50 Los anticuerpos dirigidos contra factores de coagulación se desarrollaron recientemente como agentes anticoagulantes. Ya se han descrito anticuerpos dirigidos contra Factor IX, Factor IXa, Factor X, Factor Xa, Factor XI, factor XIa, Factor VIII, Factor VIIIa, Factor V, Factor Va, Factor VII, Factor VIIa, trombina, el Factor de Von Willebrand, el Factor tisular, y otros elementos del ciclo de coagulación.

55 El documento WO 97/26010 describe anticuerpos que inhiben la coagulación en lo que se describe como "una manera autolimitada". Estos anticuerpos se caracterizan por el hecho de que concentraciones elevadas de tales anticuerpos prolongan los ensayos de coagulación, tal como el APTT, sólo de una manera limitada, y no harán incoagulable a la sangre, en contraste con dosis elevadas de agentes anticoagulantes tales como la heparina. Sin

embargo, un incremento limitado en APTT no excluye el riesgo de hemorragia. Ahora se ha demostrado que estos anticuerpos que tienen una denominada "actividad neutralizante autolimitante" pueden evitar neutralizar completamente su factor de coagulación diana, exponiendo de ese modo al paciente a riesgos de hemorragia elevados. De hecho, en pacientes con deficiencia total de factores de coagulación tales como FVIII o FIX, APTT también se prolonga de una manera sólo finita. La sangre de tales pacientes es también no incoagulable, en contraste con la sangre tratada con dosis elevadas de heparina. Sin embargo, tales pacientes con deficiencia grave de FVIII o FIX sufren enfermedades hemorrágicas dramáticas, denominadas hemofilia A o B. Puesto que los anticuerpos que inhiben factores de coagulación de una "manera autolimitada" tienen actividades biológicas que imitan al defecto de la sangre de sus pacientes, pueden exponer a los pacientes a riesgos elevados de hemorragia.

El documento WO 01/04269 describe un anticuerpo monoclonal humano, Krix-1, que sólo inhibe parcialmente la actividad de FVIII cualquiera que sea el exceso (molar) de anticuerpo con respecto a FVIII. Esta inactivación limitada de FVIII se denominó un "efecto meseta". Por comparación con anticuerpos que tienen "actividad neutralizante autolimitante", los anticuerpos tales como Krix-1 tienen la ventaja de que no pueden inactivar completamente el factor de coagulación diana. El documento WO 01/04269 A1 describe que, a pesar de esta inactivación limitada de FVIII, Krix-1 fue eficaz previniendo la trombosis en un modelo de hámster de trombosis venosa. Este anticuerpo también fue eficaz en un modelo de ratón de trombosis de vena cava (Singh et al. (2002) Blood 99, 3235-3240.). Krix-1 inhibe alrededor del 90% de la actividad de FVIII (intervalo 85-95%) en plasma humano normal. La publicación de Singh describe además un anticuerpo monoclonal humano mAb-LE2E9 que inactiva parcialmente el factor VIII (FVIII) humano, conduciendo a aproximadamente 10% de actividad residual. No aparecieron trombos en ratones de tipo salvaje tratados con mAb-LE2E9. El tratamiento con mAb-LE2E9 tampoco da como resultado un fenotipo de hemorragia grave.

Por lo tanto, el factor FVIII parece una diana potencial para fármacos anticoagulantes. Sin embargo, es probable que la tendencia a la hemorragia asociada con el uso de anticuerpos anti-FVIII estará relacionada con el grado de inhibición del factor de coagulación diana. Por lo tanto, es importante establecer métodos para generar preparaciones de anticuerpos con una relación óptima entre eficacia (acción antitrombótica) y seguridad (baja tendencia a la hemorragia).

Hasta ahora, todos los agentes anticoagulantes ensayados en estudios clínicos están asociados con un riesgo importante de hemorragia. Además, LMWH requiere administraciones subcutáneas frecuentes, y los derivados de cumarina requieren una monitorización habitual.

Por lo tanto, son deseables métodos más seguros y más eficientes para la prevención y tratamiento de enfermedades tromboembólicas venosas. Los agentes anticoagulantes ideales no deberían plantear un riesgo de complicaciones hemorrágicas o de sobredosificación. No deberían necesitar una monitorización habitual, deberían ser fáciles de administrar y deberían ser bien tolerados. Finalmente, debería estar disponible un antídoto.

Como resumen, todavía existe una necesidad estricta de buenas terapias anticoagulantes con mejores relaciones de seguridad/eficacia.

La técnica anterior describe anticuerpos monoclonales específicos, glucosilados en la región variable, en los que la modificación de la glucosilación tiene resultados completamente diferentes.

Wright (1991) Embo J. 10, 2717-2723, estudia el efecto de la modificación de la glucosilación de la región variable de un anticuerpo que se une a dextrano. Wright muestra que los cambios en la posición del hidrato de carbono en las regiones variables afectan a la unión al antígeno de diferentes maneras, oscilando desde una unión inhibitoria a una unión incrementada. Además, la estructura del hidrato de carbono varió dependiendo de la posición en la región variable; y la sustitución de aminoácidos requerida para introducir el motivo de consenso de glucosilación también tiene un impacto sobre la afinidad por el antígeno.

El anticuerpo descrito en Kato et al. (1993) Human Antib. Hybrid. 4, 9-14, muestra una unión mejorada al antígeno específico después de la desglucosilación, mientras que en Satoh (1996) Human Antib. Hybrid 7, 175-183, la desglucosilación del anticuerpo no tiene impacto sobre las propiedades de unión (véase resumen). En Khurana et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 234, 465-469, la desglucosilación del anticuerpo reduce las propiedades de unión.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo inhibidor modificado frente al Factor VIII (FVIII) o su fragmento de unión a antígeno,

- en el que el anticuerpo inhibidor no modificado comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO:2, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO:4, respectivamente, y

- en el que el anticuerpo inhibidor no modificado se produce mediante expresión de una estirpe celular de linfoblastoide humano, caracterizada porque dicha modificación es una desglucosilación total o parcial en la posición Asn 47 de SEC ID NO:2 en la secuencia de consenso de glucosilación de la cadena pesada variable, y en el que el anticuerpo no modificado tiene una actividad inhibidora disminuida frente al Factor VIII en comparación con el anticuerpo inhibidor no modificado.

En ciertas realizaciones, la secuencia de consenso de la glucosilación en las posiciones 47 a 49 de SEC ID NO: 2 está mutada por una mutación de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2 en cualquier aminoácido y/o un cambio de Thr en la posición 49 de SEC ID NO: 2 en cualquier otro aminoácido diferente de serina.

En realizaciones más particulares, la mutación es el cambio de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2 a Gln, Glu o Asp, y/o en las que la mutación es el cambio de Thr en la posición 49 de SEC ID NO: 2 a Ala.

En ciertas realizaciones, la desglucosilación total o parcial es una desglucosilación de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2.

En realizaciones particulares, el fragmento es un fragmento scFv, un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

En realizaciones más particulares, el fragmento scFv está representado por los aminoácidos 21 a 282 de SEC ID NO: 26.

El anticuerpo inhibidor no modificado frente a FVIII tiene en ciertas realizaciones una secuencia de cadena pesada variable según se representa mediante los aminoácidos 20 a 165 de SEC ID NO: 2, y una secuencia de cadena ligera variable según se representa mediante los aminoácidos 21 a 143 de SEC ID NO: 4.

En realizaciones particulares, el anticuerpo inhibidor no modificado frente a FVIII es el anticuerpo como se obtiene a partir de la estirpe celular Krix-1 depositada como LMBP 5089CB.

Otro aspecto de la invención se refiere a una mezcla de:

- el anticuerpo inhibidor modificado o el fragmento como se describe anteriormente, y
- el anticuerpo inhibidor no modificado o su fragmento de unión a antígeno que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO:2, respectivamente, y que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO:4, respectivamente, y cuyo anticuerpo inhibidor no modificado o su fragmento de unión a antígeno se produce mediante expresión en una estirpe celular de linfoblastoide humano.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo inhibidor modificado frente al Factor VIII (FVIII) o su fragmento de unión a antígeno como se describe anteriormente, o que comprende la mezcla como se describe en el párrafo anterior.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo inhibidor modificado frente al Factor VIII (FVIII) o su fragmento de unión a antígeno como se describe anteriormente, o que comprende la mezcla descrita anteriormente, para tratar o prevenir un trastorno tromboembólico, incluyendo, pero sin limitarse a, prevenir trombosis de venas profundas, embolia pulmonar como consecuencia de intervención quirúrgica, o trombofilia hereditaria crónica, o trombofilia adquirida, y tratar trombosis de venas profundas, embolia pulmonar, apoplejía, fibrilación ventricular, infarto de miocardio no de onda Q, infarto de miocardio elevado no ST, angina inestable, septicemia o SIRS.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un anticuerpo inhibidor modificado frente al Factor VIII (FVIII) o su fragmento de unión a antígeno como se describe anteriormente, o que comprende la mezcla descrita anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno tromboembólico, incluyendo, pero sin limitarse a, prevención de trombosis de venas profundas, embolia pulmonar como consecuencia de intervención quirúrgica, o trombofilia hereditaria crónica, o trombofilia adquirida, y para el tratamiento de trombosis de venas profundas, embolia pulmonar, apoplejía, fibrilación ventricular, infarto de miocardio no de onda Q, infarto de miocardio elevado no ST, angina inestable, septicemia o SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), en el que este medicamento comprende además, para administración concomitante, un fármaco o fármacos para inhibir la agregación plaquetaria, tal como aspirina.

En realizaciones particulares, para el tratamiento de infarto de miocardio agudo, el medicamento comprende además, para administración concomitante, un fármaco o fármacos para inhibir la agregación plaquetaria, tal como abciximab, o comprende además un agente trombolítico, tal como activador de plasminógeno tisular, estafilocinasa o microplasmina.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método in vitro para obtener una librería de al menos dos anticuerpos inhibidores contra el factor VIII con actividad inhibidora máxima variable, en el que el método comprende las etapas de:

- 5 - proporcionar un anticuerpo inhibidor glucosilado contra FVIII o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO:2, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO:4,
- 10 - modificar la glucosilación de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2, y
- seleccionar al menos un anticuerpo o fragmento que tenga una actividad inhibidora máxima diferente.

En realizaciones particulares, el método comprende además la etapa de seleccionar aquellos anticuerpos o fragmentos, para los cuales la afinidad no se ve sustancialmente afectada.

15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método in vitro para producir un anticuerpo inhibidor frente a FVIII o un fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibiendo el anticuerpo o fragmento FVIII entre 20 y 85% a concentración saturante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, comprendiendo el método las etapas de

- 20 - proporcionar un anticuerpo inhibidor intacto contra FVIII o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO:2, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO:4,
- modificar la glucosilación en Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2,
- 25 - evaluar la capacidad del anticuerpo inhibidor modificado o del fragmento para inhibir FVIII entre 20 y 85% a concentración saturante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una mezcla que comprende un anticuerpo como se describe anteriormente bajo "primer aspecto", y que comprende otro anticuerpo que es un anticuerpo inhibidor contra FVIII.

30 En realizaciones particulares, el otro anticuerpo es el anticuerpo que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 54, 69 a 85 y 118 a 128 de SEC ID NO:30, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 42 a 52, 68 a 74 y 106 a 116 de SEC ID NO: 32, respectivamente.

35 Aún otras realizaciones de la invención se refieren a una de las mezclas anteriores, y a composiciones farmacéuticas que comprenden la mezcla en la que los anticuerpos se mezclan juntos en una relación apropiada para lograr una inhibición máxima dada de la actividad de FVIII, cualquiera que sea el exceso de la mezcla de anticuerpos con respecto a FVIII.

En la descripción y ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias:

SEC ID NO: 1:	secuencia nucleotídica que codifica la región variable de la cadena pesada de Krix-1
SEC ID NO: 2:	secuencia de aminoácidos que comprende las regiones CDR de la cadena pesada de Krix-1
SEC ID NO: 3:	secuencia nucleotídica que codifica la región variable de la cadena ligera de Krix-1
SEC ID NO: 4:	secuencia de aminoácidos que comprende las regiones CDR de la cadena ligera de Krix-1
SEC ID NO: 5:	cadena pesada del cebador directo de Krix-1 recombinante
SEC ID NO: 6:	cadena pesada del cebador inverso de Krix-1 recombinante
SEC ID NO: 7:	cadena ligera del cebador directo de Krix-1 recombinante
SEC ID NO: 8:	cadena ligera del cebador inverso de Krix-1 recombinante
SEC ID NO: 9:	cebador directo de Krix-1Q
SEC ID NO: 10:	inverso de Krix-1Q cebador
SEC ID NO: 11:	cebador directo de Krix-1A
SEC ID NO: 12:	cebador inverso de Krix-1 A
SEC ID NO: 13:	cebador directo de Krix-1 E
SEC ID NO: 14:	cebador inverso de Krix-1 E
SEC ID NO: 15:	cebador directo de Krix-1 D
SEC ID NO: 16:	cebador inverso de Krix-1 D
SEC ID NO:17:	cebador directo de scFv-KRIX-1VL
SEC ID NO:18:	cebador inverso de scFv-KRIX-1VL
SEC ID NO:19:	cebador directo de scFv-KRIX-1VH
SEC ID NO:20:	cebador inverso de scFv-KRIX-1VH
SEC ID NO:21:	cebador directo de scFv-KRIX-1VLVH con etiqueta His(6)
SEC ID NO:22:	cebador inverso de scFv-KRIX-1VLVH con etiqueta His(6)
SEC ID NO:23:	cebador directo de scFv- Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)
SEC ID NO:24:	cebador inverso de scFv- Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)
SEC ID NO:25:	secuencia nucleotídica que comprende el scFv- Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)
SEC ID NO:26:	secuencia de aminoácidos que comprende el scFv- Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)
SEC ID NO:27:	cebador directo de CHO-scFvKRIX-1VLVHQ(His)
SEC ID NO:28:	cebador inverso de CHO-scFvKRIX-1 VLVHQ(His)
SEC ID NO:29:	secuencia nucleotídica que codifica la región RHD5 VH
SEC ID NO:30:	secuencia de aminoácidos que comprende la región RHD5 VH
SEC ID NO:31:	secuencia nucleotídica que codifica la región RHD5 VL
SEC ID NO:32:	secuencia de aminoácidos que comprende la región RHD5 VL

DEFINICIONES

5 El término “anticuerpo” (“Ab”), como se usa aquí, se refiere a una molécula de anticuerpo monoclonal o policlonal. “Fragmentos” de un anticuerpo incluye moléculas que comprenden:

10 ya sea cadenas tanto pesadas como ligeras (tales como Fab, F(ab)₂, F(ab')₂ o ScFv) o cadenas pesadas o ligeras individuales (por ejemplo dímeros de cadena ligera), incluyendo opcionalmente su región constante (o sus partes), o modificaciones opcionalmente menores (tales como variantes alotópicas) de esa región constante, partes, de las mismas, en particular las partes determinantes de la especificidad de las mismas, es decir, las regiones variables de los anticuerpos, sus subpartes, en particular sus partes hipervariables, tales como péptidos formados de tramos de aminoácidos que comprenden al menos una CDR, opcionalmente con secuencias de armazón adyacentes, por ejemplo secuencias de hasta alrededor de 10 aminoácidos en una o ambas CDR.

15 Opcionalmente, según la presente invención, los anticuerpos son anticuerpos IgG, particularmente IgG1. F(ab')₂ se refiere al fragmento de anticuerpo obtenible tras la escisión con pepsina, y está construido tanto de cadenas ligeras como partes de las cadenas pesadas enlazadas por disulfuro vía la región bisagra. El fragmento Fab es obtenible a partir del anticuerpo intacto o a partir del F(ab')₂ mediante digestión con papaína de la región bisagra, y contiene una

cadena ligera y una parte de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden obtener mediante síntesis o por métodos recombinantes descritos en la técnica. Los fragmentos tales como los fragmentos scFv se pueden obtener mediante amplificación por PCR de las partes relevantes de la secuencia nucleotídica del anticuerpo, y clonando éstas en un vector de expresión junto con secuencias adicionales apropiadas tales como una secuencia ligadora en el caso de un fragmento scFv.

La expresión “anticuerpo nativo”, como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo inhibidor glucosilado. La glucosilación del “anticuerpo nativo” es la glucosilación como se observa bajo cultivo estándar de una estirpe celular de linfoblastoide que produce dicho anticuerpo, es decir, sin modificar mediante la adición de enzimas o por mutaciones. Preferiblemente, tal anticuerpo nativo es un anticuerpo de tipo salvaje, pero se prevé que puede ser un anticuerpo que se ha modificado en un sitio diferente de la secuencia de consenso de glucosilación. Adicionalmente, un fragmento F(ab) u otro fragmento de un anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo “nativo” en el contexto de esta definición, ya que contiene el patrón de glucosilación como está presente en el anticuerpo intacto. En el contexto de la presente invención, cuando se haga referencia a la glucosilación de un anticuerpo derivado de Krix-1 en comparación con el anticuerpo Krix-1 nativo, se pretende una comparación con el anticuerpo según se obtiene a partir de la estirpe celular Krix-1 (depositada como LMBP 5089CB), en condiciones de cultivo estándar.

El término “derivado”, como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que se ha alterado química o genéticamente de una manera que no afecte a su longitud o glucosilación en la región variable.

Un “anticuerpo modificado” o “fragmento de anticuerpo modificado”, como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo que, en comparación con el anticuerpo de tipo salvaje, es diferente con respecto a su tamaño, más particularmente, que es diferente con respecto a su glucosilación, pero con una afinidad similar por su ligando como el anticuerpo de tipo salvaje. La actividad inhibidora del anticuerpo también se puede modificar reduciendo el tamaño del anticuerpo sin modificar la afinidad, por ejemplo produciendo fragmentos (por ejemplo, fragmentos Fab y fragmentos expresados recombinantemente, tales como fragmentos ScFV).

Un anticuerpo que tiene tanto cadenas pesadas como ligeras enlazadas mediante puentes de disulfuro (es decir, que tiene un tamaño idéntico al anticuerpo de tipo salvaje) se denomina como anticuerpo “intacto” (independientemente de su estado de glucosilación).

Se entiende que el concepto de la presente invención se puede aplicar tanto a anticuerpos intactos como a fragmentos de anticuerpos, es decir, un fragmento de anticuerpo (obtenible mediante métodos diferentes como se describe aquí) se puede modificar para afectar adicionalmente a su actividad inhibidora, ya sea mediante una fragmentación adicional o mediante desglucosilación.

La expresión “anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) con glucosilación modificada”, como se usa aquí, se refiere a anticuerpos o sus fragmentos que se han manipulado mediante ingeniería o se han producido de una manera que su glucosilación difiere de aquella del anticuerpo nativo, queriendo decir que faltan ciertos hidratos de carbono con respecto al anticuerpo nativo.

Un “anticuerpo inhibidor” o un “anticuerpo con actividad inhibidora”, como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo que inhibe la actividad de su proteína diana al menos parcialmente. Los anticuerpos inhibidores anti-Factor VIII de la presente invención inhiben la unión de FVIII a otros factores, tales como vWF y/o fosfolípidos. Estos anticuerpos están dirigidos contra el dominio C1 de FVIII. Los anticuerpos inhibidores pueden ser aloanticuerpos contra FVIII exógeno. Los anticuerpos inhibidores pueden ser de origen humano o animal. En el contexto de anticuerpos que inhiben la actividad de factores de la cascada de coagulación, también denominados aquí como anticuerpos anti-coagulantes, la actividad inhibidora máxima del anticuerpo puede ser crítica, y la inhibición total de la coagulación puede provocar efectos secundarios tales como hemorragia descontrolada.

Una actividad inhibidora máxima variable, como se usa aquí, se refiere a una actividad inhibidora máxima, como se define para un anticuerpo o una mezcla de anticuerpos según la presente invención, que se puede modificar. En la presente invención, la actividad inhibidora máxima de un anticuerpo contra FVIII está disminuida por modificación de la glucosilación, más particularmente por desglucosilación de la región variable. De este modo, se obtienen anticuerpos con actividad inhibidora máxima variable. En el contexto de la presente invención, se entiende que para que un anticuerpo sea considerado como inhibidor, su efecto inhibidor debe ser al menos 1%.

“Regiones que determinan la complementariedad (CDR)”, en la presente invención, se refiere a las secuencias de aminoácidos hipervariables en regiones variables del anticuerpo que interaccionan con el epítipo en el antígeno. Las regiones CDR son las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) variables, respectivamente (L1, L2, L3 y H1, H2, H3, respectivamente), de anticuerpos dirigidos contra el Factor VIII.

“Anticuerpo humanizado”, como se usa aquí, se refiere a moléculas de anticuerpos no humanos en las que los aminoácidos se han sustituido en las regiones que no se unen al antígeno, a fin de asemejarlas más estrechamente a un anticuerpo humano.

Un “anticuerpo humano reconformado” o un “anticuerpo híbrido humano”, como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo humano en el que se han sustituido aminoácidos en las regiones de unión al antígeno por secuencias

según la presente invención, por ejemplo CDR's, u otras partes de regiones variables que se han derivado a partir del repertorio de anticuerpos humanos.

5 Comparaciones de secuencias. Las comparaciones de secuencias proteicas o nucleotídicas se designan en términos de identidad de secuencias o similitud de secuencias. Cuando según la presente invención se realizan comparaciones entre secuencias de aminoácidos de dos regiones VH o de dos regiones VL, o se realizan comparaciones entre dos secuencias nucleotídicas que codifican CDRs, o secuencias que comprenden CDRs, el nivel de identidad de secuencias o similitud entre dos secuencias puede incluir que tenga al menos 80%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferible al menos 99% de identidad o similitud de secuencias entre las dos secuencias.

10 Secuencias nucleotídicas o de aminoácidos que son "idénticas" significa que, cuando las dos secuencias están alineadas, el porcentaje de identidad de secuencias, es decir, el número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, es mayor que 80%, preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, lo más preferible al menos 99%, más específicamente es 100%. El alineamiento de dos secuencias nucleotídicas se lleva a cabo mediante el algoritmo como se describe por Wilbur y Lipmann (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 726, usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización de salto de 4.

15 Dos aminoácidos se consideran "similares" si pertenecen a uno de los siguientes grupos GASTCP; VILM; YWF; DEQN; KHR. De este modo, secuencias que son similares significa que, cuando las dos secuencias proteicas están alineadas, el número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos o similares dividido entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las secuencias, es mayor que 80%, preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, lo más preferible al menos 99%, más específicamente es 100%.

20 El término "modificado" significa cualquier molécula proteica (o polipeptídica) en la que un único o un número de aminoácidos se han sustituido por cualquier otro resto de aminoácido, o se han suprimido. Tal sustitución o supresión de aminoácidos puede estar localizada en cualquier parte en la molécula proteica. También representa moléculas proteicas en las que restos de aminoácidos han sido sustituidos y/o eliminados en más de una única localización. En este último caso, se puede considerar cualquier combinación de sustitución y eliminación. También se refiere a polimorfismos (es decir, la aparición habitual y simultánea en una única población que se reproduce endogámicamente de dos o más alelos de un gen, en el que la frecuencia de los alelos más raros es mayor, típicamente mayor que 1%, que lo que se puede explicar por mutación recurrente sola).

25 La expresión "modificar la glucosilación de un anticuerpo a nivel post-traduccional" se refiere a modificaciones tales como el cambio de las condiciones de cultivo de células que expresan el anticuerpo, el cambio del tipo celular para que exprese anticuerpos, y el uso de enzimas desglucosilantes y/o glucosilantes, ya sea intracelularmente en la célula que expresa un anticuerpo o parte de un anticuerpo, o tratando un anticuerpo intacto o parte del mismo con estas enzimas.

30 La expresión "enzimas que escinden o transforman hidratos de carbono", como se usa aquí, se refiere a enzimas que son capaces de escindir hidratos de carbono, partes de una estructura de hidrato de carbono y/o diferentes moléculas acopladas a ellos (como N-acetilo) procedente de una proteína, un péptido o un cierto aminoácido en ella, o que son capaces de unir covalentemente hidratos de carbono a aminoácidos o a otros hidratos de carbono en una proteína o péptido. Los ejemplos de tales enzimas de escisión son el péptido N-4(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), también denominada N-glucosidasa F, beta-galactosidasa, sialidasa, α - y β -manosidasa, α -fucosidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, y hialuronidasa. Las enzimas glucosilantes incluyen sialiltransferasas y otras glucosiltransferasas.

35 "Región que se une a antígeno", como se usa aquí, se refiere a la región de un anticuerpo implicada en la unión del antígeno. Más en particular, la región que se une a antígeno se puede determinar como los aminoácidos y sus sustituyentes que entran en contacto a través de aminoácidos o moléculas de la proteína diana que no se enlazan covalentemente.

Nomenclatura: el anticuerpo monoclonal KRIX-1 producido en una estirpe celular de linfoblastoide (LCL) se denomina Krix-1.

El anticuerpo monoclonal KRIX-1 producido en la estirpe celular CHO se denomina CHO-recKrix-1.

40 Un anticuerpo monoclonal KRIX-1 con una sustitución de Asn47 a Gln se denomina Asn47Gln Krix-1 o Krix-1Q.

El anticuerpo monoclonal KRIX-1 con una sustitución de Asn47 a Asp y producido en células CHO se denomina Asn47Asp Krix-1 o Krix-1 D.

El anticuerpo monoclonal KRIX-1 con una sustitución de Asn47 a Glu y producido en células CHO se denomina Asn47Glu Krix-1 o Krix-1 E.

45 El anticuerpo monoclonal KRIX-1 con una sustitución de Thr49 a Ala y producido en células CHO se denomina

Asn47Gln Krix-1 o Krix-1 A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se describirá con referencia a ciertas realizaciones y a ciertas figuras, pero la presente invención no está limitada a ellas, sino sólo por las reivindicaciones.

5 Se describe aquí un método para modificar la actividad inhibidora de un anticuerpo, preferiblemente sin afectar significativamente a la afinidad. Se describen además anticuerpos o sus fragmentos obtenidos mediante tal método, y su uso en el desarrollo de mezclas de anticuerpos con una actividad inhibidora máxima variable de su diana proteica; más en particular, anticuerpos monoclonales humanos o sus fragmentos modificados de diferentes maneras que afectan el tamaño del anticuerpo y no su afinidad, para inhibir parcialmente de manera máxima
10 variable un factor de coagulación. Estos se pueden usar como agentes antitrombóticos. Tales anticuerpos y fragmentos de tales anticuerpos se usan en una preparación farmacéutica.

15 Se describe aquí además un método para obtener una librería de al menos dos anticuerpos inhibidores contra el factor VIII con actividad inhibidora máxima variable y con sustancialmente la misma afinidad. El método comprende modificar el tamaño de un anticuerpo inhibidor contra el FVIII o su fragmento mediante la modificación de la glucosilación en la región variable de dicho anticuerpo inhibidor, o mediante la reducción de los anticuerpos hasta un fragmento de unión a antígeno, tras cuyas modificaciones se seleccionan los anticuerpos o fragmentos para los cuales no se ve afectada sustancialmente la afinidad por FVIII.

20 Se proporcionan métodos para modificar la actividad inhibidora de un anticuerpo inhibidor o un fragmento del mismo mediante la modificación de la glucosilación, por ejemplo en una región variable del anticuerpo. La afinidad de dichos anticuerpos por su proteína diana puede verse afectada sólo de manera limitada. Particularmente, la constante de disociación del anticuerpo modificado o su fragmento se modifica por un factor menor que 3, preferiblemente menor que 2, lo más preferible menor que 1,5. Se demuestra que los anticuerpos o sus fragmentos se pueden desarrollar con una capacidad inhibidora modificada, pero una afinidad similar, mediante modificación de la glucosilación en una región variable del anticuerpo, y se describe aquí un método para disminuir la actividad
25 inhibidora de un anticuerpo inhibidor o un fragmento del mismo mediante desglucosilación. Estos anticuerpos son de uso en situaciones en las que se requiere una inhibición variable o submáxima de una proteína diana, como en el campo de la coagulación. La producción de fragmentos de anticuerpos se usa para obtener modulaciones adicionales de la actividad inhibidora, fragmentos los cuales se pueden modificar mediante desglucosilación. De tal forma, se obtiene una serie de diferentes anticuerpos con una actividad inhibidora máxima variable.

30 La actual limitación de anticuerpos monoclonales humanos contra FVIII o sus fragmentos es que no hay ningún método que permita la producción de anticuerpos con cualquier "inhibición de meseta" dada, lo que permitiría la selección de los anticuerpos o fragmentos con una relación óptima entre seguridad y eficacia para tratar o prevenir la trombosis.

35 Se describe aquí adicionalmente un método para obtener anticuerpos o sus fragmentos con una actividad inhibidora máxima variable pero afinidad similar modificando la glucosilación, más específicamente en la región variable. En una realización, la afinidad de un anticuerpo o fragmento con glucosilación modificada es menor que 1 nM. Sin estar limitados por la teoría, se cree que este método es particularmente adecuado para aquellos anticuerpos en los que el epítipo de la proteína diana que corresponde al sitio de unión a antígeno está en la vecindad pero no corresponde exactamente al sitio activo o interactivo de dicha proteína. La modificación de la glucosilación se obtiene
40 opcionalmente exponiendo los anticuerpos nativos o sus fragmentos a enzimas que escinden o transforman hidratos de carbono. Como alternativa, los anticuerpos con glucosilación modificada se obtienen produciendo los anticuerpos en estirpes celulares con enzimas de glucosilación adecuadas o modificando las condiciones del cultivo celular para modificar la actividad de las enzimas de glucosilación de la estirpe celular que produce los anticuerpos. Los anticuerpos con glucosilación modificada se pueden obtener modificando genéticamente el anticuerpo a fin de
45 eliminar o introducir sitios de glucosilación, por ejemplo mutagénesis dirigida al sitio. Como alternativa, los anticuerpos con glucosilación modificada se obtienen mediante síntesis química. Los fragmentos se pueden obtener a partir de anticuerpos completos, o se pueden producir directamente mediante síntesis recombinante o química por métodos descritos en la técnica. Los anticuerpos o fragmentos con una capacidad inhibidora modificada (y preferiblemente una afinidad sustancialmente no afectada) se identifican opcionalmente midiendo la capacidad
50 inhibidora (y la afinidad) de un anticuerpo nativo, modificando la glucosilación del anticuerpo, y midiendo nuevamente la capacidad inhibidora (y la afinidad) del anticuerpo modificado. De este modo, según una realización particular, la presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo inhibidor de FVIII o su fragmento, inhibiendo dicho anticuerpo o fragmento a FVIII entre 20 y 85% a concentraciones saturantes, que comprende las etapas de:

- 55
- proporcionar un anticuerpo inhibidor de FVIII intacto o su fragmento, y
 - modificar la glucosilación de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo a nivel post-traduccional, o modificar la glucosilación de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo alterando aminoácidos esenciales en la secuencia de consenso de glucosilación de la región variable de dicho anticuerpo.

El método descrito de la invención se puede aplicar en el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra una proteína que está implicada en un complejo, es decir, una proteína que para su función biológica requiera la interacción con otras proteínas. El método de la invención se usa para modificar la actividad inhibitoria de anticuerpos o sus fragmentos dirigidos contra un elemento del sistema de hemostasia o polipéptidos u otras moléculas que se unen a un elemento del sistema de hemostasia, aún más en particular a factores de la cascada de coagulación, a fin de obtener anticuerpos con un efecto inhibitorio variable sobre la coagulación de la sangre. De este modo, se presenta un método que es de uso particular a la hora de modificar el efecto inhibitorio de anticuerpos inhibidores dirigidos contra Factor V, Factor VII, Factor VIII (FVIII), Factor IX, Factor X, Factor XI, trombina, el Factor de von Willebrand u otros elementos de la cascada de coagulación, para obtener anticuerpos con actividad anticoagulante máxima variable.

La modificación de la glucosilación de la presente invención se aplica al anticuerpo Krix-1 contra FVIII o un fragmento del mismo. El método de la invención se usa para obtener anticuerpos Krix-1 modificados, o sus fragmentos, que demuestran inhibición máxima variable de FVIII. Más particularmente, se describe un método para obtener anticuerpos Krix-1 modificados con una capacidad inhibitoria entre 20% y 90%, más en particular entre 20% y 80%, aún más en particular entre 20% y 70%, y todavía más en particular entre 20% y 60%.

Se describen adicionalmente anticuerpos inhibidores o sus fragmentos obtenidos mediante el método mencionado anteriormente con glucosilación modificada y una actividad inhibitoria modificada, y caracterizados porque la afinidad de dichos anticuerpos o sus fragmentos por su proteína diana no se ve afectada sustancialmente, así como también fragmentos, derivados y proteínas que son similares a dichos anticuerpos, incluyendo tales anticuerpos fragmentos de los mismos tales como, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y scFvs. En una realización particular de la invención, se describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que demuestran una inhibición máxima variable de FVIII.

La presente invención describe anticuerpos y sus fragmentos que inhiben la actividad de FVIII en alrededor de 85, 50, 40, 30 y 20%. Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal contra el factor de coagulación que inhibe menos del 65% de la actividad de FVIII y que evita la trombosis en modelos de trombosis en mamíferos.

La presente invención se refiere además a anticuerpos monoclonales o a sus fragmentos modificados según se compara con Krix-1, por cuanto una glucosilación alterada ha dado como resultado una inhibición máxima diferente de la actividad de FVIII. Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo Krix-1 modificado o a un fragmento del mismo que es un anticuerpo monoclonal contra el factor de coagulación que inhibe menos del 65% de la actividad de FVIII y que evita la trombosis en modelos de trombosis en mamíferos.

La presente invención se refiere además a anticuerpos inhibidores o anticoagulantes y a sus fragmentos dirigidos contra FVIII derivados de una estirpe celular denominada Krix-1, con una actividad inhibitoria modificada pero que retiene afinidad similar por FVIII como Krix-1. En una realización más particular, dicho anticuerpo deriva de Krix-1 o un fragmento del mismo o un análogo producido recombinantemente de tal anticuerpo modificado, más en particular las regiones variables de dicho anticuerpo tienen una similitud de aminoácidos de al menos 80%, preferiblemente al menos 90% o más con el anticuerpo Krix-1 o un fragmento del mismo. Tales anticuerpos incluyen anticuerpos o sus fragmentos que comprenden una región variable de cadena pesada inmunoglobulínica que comprende una secuencia que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, lo más preferible al menos 98% de homología de secuencias con SEC ID NO:2, en el que Asn en la posición 47 se ha modificado a glutamina, ácido aspártico, o ácido glutámico, o en el que Thr en la posición 49 se ha modificado a alanina.

Tales anticuerpos incluyen anticuerpos obtenidos mediante reordenación de cadenas, con lo que el sitio de unión a antígeno del anticuerpo tiene la especificidad epitópica del Krix-1 modificado, por ejemplo tiene la especificidad epitópica de KRIX-1Q o KRIX-1A. Tales anticuerpos incluyen además fragmentos del Krix-1 modificado o fragmentos de Krix-1 modificado según la presente invención, con la condición de que tengan actividad anticoagulante. De este modo, la invención también se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que una región variable de dicho anticuerpo se modifica para introducir o eliminar un sitio de N-glucosilación, caracterizado dicho anticuerpo por inhibir la función de un factor de coagulación de manera limitada, con lo que se inhibe la trombosis y se logra la inhibición parcial de la coagulación.

En una realización particular de la presente invención, dicho anticuerpo es el anticuerpo recombinante de Krix-1 o un fragmento del mismo, producido en cualquier célula hospedante adecuada, por ejemplo en células CHO. En todavía una realización más particular, dicho anticuerpo es un mutante de Krix-1 con N-glucosilación modificada en la región variable, más particularmente con un sitio de glucosilación mutado en las posiciones Asn47 a Thr49, más en particular con Asn47 cambiado a Gln47 (KRIX-1Q), Glu47 (KRIX-1E) o Asp47 (KRIX-1D) y/o Thr49 a Ala49 (KRIX-1A).

Además, la invención se refiere a las estirpes celulares que producen los anticuerpos según la presente invención, más particularmente las estirpes celulares que producen anticuerpos con modificaciones post-traduccionales alteradas, más particularmente con las características de Krix-1, KRIX-1Q o KRIX-1A.

Según otro aspecto de la invención, dos o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con diferente actividad inhibitoria máxima de un ligando se pueden combinar dando como resultado una mezcla con una actividad inhibitoria intermedia. Una realización particular de la invención es una mezcla de dos o más anticuerpos inhibidores contra FVIII o sus fragmentos, que asegura una inhibición máxima dada de FVIII, independientemente del exceso de la mezcla de anticuerpos con respecto a FVIII. Usando combinaciones de diferentes anticuerpos inhibidores y/o sus fragmentos en relaciones específicas, se pueden obtener mezclas con actividad inhibitoria específica de FVIII. De este modo, la presente invención se refiere a una combinación de dos o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con diferentes actividades inhibitorias máximas. Según una realización específica, el anticuerpo nativo se combina con uno o más anticuerpos o sus fragmentos que tienen una menor actividad inhibitoria. Según una realización adicional, el anticuerpo nativo se combina con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una glucosilación modificada con respecto al anticuerpo nativo. Tales combinaciones o mezclas son de interés para el ajuste posterior de la actividad inhibitoria del anticuerpo, por ejemplo en el desarrollo de fármacos específicos para pacientes como se describe aquí.

La invención se refiere además al uso de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención para la inhibición controlada de procesos biológicos, más particularmente en aplicaciones terapéuticas. La invención se refiere además al uso de una combinación de anticuerpos o sus fragmentos con diferente actividad inhibitoria máxima de FVIII como composición terapéutica. Una realización particular de la invención se refiere al uso de mezclas de uno o más de los anticuerpos o fragmentos de la presente invención que tienen glucosilación modificada con los anticuerpos o fragmentos no modificados correspondientes para la inhibición controlada de su ligando común. De este modo, otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos o sus fragmentos, más particularmente uno o más anticuerpos o sus fragmentos que tienen glucosilación modificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Más particularmente, la utilidad de los anticuerpos con actividad inhibitoria modificada se demuestra en el campo de trastornos de la coagulación. Los anticuerpos y sus fragmentos según la invención son de uso para la inhibición controlada de la coagulación. De este modo, la invención se refiere al uso de anticuerpos o sus fragmentos con actividad inhibitoria modificada de factores de coagulación en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de sujetos que sufren un trastorno de coagulación, más en particular una enfermedad tromboembólica venosa. La presente invención se refiere además a dichos anticuerpos o fragmentos para tratar trastornos de la coagulación. Un objeto particular de la presente invención es proporcionar agentes antitrombóticos eficaces con riesgo reducido de hemorragia en animales, particularmente en seres humanos. Esto se logra con anticuerpos o fragmentos de la presente invención con actividad inhibitoria máxima modificada de factores de coagulación, y sus mezclas, más particularmente con el uso de anticuerpos inhibidores o fragmentos dirigidos contra FVIII con actividad inhibitoria máxima modificada.

Se describe aquí un método de tratamiento que comprende administrar una dosis eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales terapéuticos o sus fragmentos que se han modificado de tal manera para modificar o introducir un sitio de glucosilación en el anticuerpo a fin de modificar el efecto inhibitorio de dicho anticuerpo sobre la actividad y/o la interacción o interacciones del ligando reconocido por el mencionado anticuerpo o anticuerpos con otras proteínas o reactivos que interaccionan con el mencionado ligando.

Se describe aquí un método para inhibir trombosis, que comprende administrar una dosis eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales o sus fragmentos, que inhiben un factor implicado en la coagulación. En una realización particular de la invención, el anticuerpo o al menos uno de los anticuerpos se modifica de tal forma para modificar o introducir un sitio de glucosilación en el anticuerpo a fin de modificar el efecto inhibitorio de dicho anticuerpo sobre la interacción o interacciones del ligando reconocido por el mencionado anticuerpo con otras proteínas o reactivos que interaccionan con el mencionado ligando. Específicamente, se describe un método para ajustar un tratamiento antitrombótico a la situación clínica del paciente basándose en la variación de la actividad inhibitoria máxima de anticuerpos anticoagulantes o sus fragmentos. De este modo, la presente invención se refiere a la formulación de un medicamento para el tratamiento o prevención de trombosis, teniendo en cuenta la situación clínica del paciente, que comprende la selección de uno o más anticuerpos a fin de obtener actividad inhibitoria máxima, adecuada para dicho tratamiento.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención es una formulación farmacéutica para inhibir trombosis, la cual se puede ajustar basándose en las necesidades clínicas del paciente, que comprende una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anticoagulante, o una mezcla del mismo derivada de Krix-1 en el que se ha modificado la glucosilación en la región variable, opcionalmente en una mezcla con Krix-1 sin modificar.

Como alternativa, tal composición farmacéutica es una mezcla de dos compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en Krix-1 nativo, un fragmento de Krix-1 nativo, Krix-1 con glucosilación modificada en la región variable, y un fragmento de Krix-1 con una glucosilación modificada en la región variable.

Más particularmente, el compuesto farmacéutico comprende uno o más anticuerpos monoclonales que se han modificado en la glucosilación en la región Asn47-Thr49. Opcionalmente, esta modificación es una mutación, más en particular con Asn47 cambiado en Gln47 (KRIX-1Q), Glu47 (KRIX-1E) o Asp47 (KRIX-1D) y/o Thr49 en Ala49 (KRIX-1A). Como alternativa, esta modificación se obtiene poniendo en contacto el anticuerpo Krix-1 nativo o sus

fragmentos con condiciones que aseguran la modificación de la glucosilación en Asn47-49 (tal como niveles crecientes de enzimas de desglucosilación o niveles crecientes de enzimas implicadas en la glucosilación, estirpes celulares diferentes para expresar anticuerpos, o formulaciones de medios usadas para el cultivo de las estirpes celulares).

5 En consecuencia, un aspecto de la presente invención es una librería que comprende al menos dos anticuerpos anticoagulantes con capacidad inhibidora máxima variable de FVIII pero con afinidad similar por FVIII. Según una realización particular, dicha librería comprende anticuerpos derivados de Krix-1 mediante modulación de la glucosilación de la región variable de Krix-1. La invención se refiere además a un método para fabricar un medicamento para el tratamiento controlado o la inhibición de la coagulación en el tratamiento de trombosis, que
10 comprende seleccionar uno o más de dichos anticuerpos monoclonales anticoagulantes derivados de Krix-1 a partir de la librería de la invención. Particularmente, la librería comprende anticuerpos derivados de Krix-1 mediante desglucosilación del sitio de glucosilación situado en Asn47-Thr49.

Aún otro aspecto de la invención se refiere a un método para la identificación de un anticuerpo que compite con un anticuerpo inhibidor de FVIII, que comprende las etapas de poner en contacto FVIII o un fragmento de FVIII que comprende el dominio C1 con un primer anticuerpo inhibidor y un anticuerpo inhibidor candidato, y evaluar la capacidad de dicho anticuerpo candidato para competir con la unión del anticuerpo inhibidor de FVIII a dicho FVIII o fragmento de FVIII. En una realización particular de la invención, el anticuerpo inhibidor de FVIII conocido, usado para la identificación de nuevos anticuerpos competidores, es Krix-1. Según una realización particular de la invención, los anticuerpos obtenidos de tal manera se seleccionan adicionalmente en busca de su actividad inhibidora de FVIII. De este modo, la presente invención también se refiere a anticuerpos (purificados) obtenidos a partir de este método que se pueden usar en mezclas junto con Krix-1 o sus modificaciones según la presente invención, y en la generación de composiciones farmacéuticas.

Se observó recientemente que un anticuerpo recombinante producido en células CHO inhibió FVIII de forma significativamente diferente del anticuerpo producido en células de linfoblastoide humano. Esta observación inesperada indicó que la modificación post-traduccional podría modular la actividad inhibidora de anticuerpos dirigidos contra FVIII, más particularmente de Krix-1. La identificación de un sitio de glucosilación en la región variable de Krix-1 mostró además que la glucosilación de la región variable podría modular la actividad de Krix-1.

Por lo tanto, se investigó la actividad de Krix-1 tratado con enzima que elimina estructuras de hidratos de carbono. La desglucosilación de Krix-1 modificó drásticamente su actividad inhibidora (disminuyendo hasta alrededor de 60%). Sin embargo, la afinidad de Krix-1 por FVIII no cambió significativamente. Estas observaciones fueron inesperadas, debido a que nunca se ha dado a conocer antes que la glucosilación puede modificar la función de un anticuerpo salvo por la alteración de la afinidad o especificidad. Además, los glucanos que actúan como ligandos para receptores se unen de una manera específica de la estructura, dando como resultado una señal de on/off, no susceptible a la modulación. La capacidad para modificar la actividad de un anticuerpo sin modificar significativamente su especificidad o afinidad hace posible ajustar la actividad inhibidora, por ejemplo limitar la actividad inhibidora para suprimir posibles efectos secundarios, tal como en el caso de anticuerpos anticoagulantes. Además, la posibilidad para obtener una selección de anticuerpos con la misma afinidad por el antígeno pero diferente actividad inhibidora permite el mezclado de diferentes anticuerpos "modificados en los glucanos" para generar una preparación de anticuerpos con actividad inhibidora máxima diferente (y muy específica) ("meseta"). Además, la limitación de la modificación de la glucosilación a la región variable asegura que no se vean afectadas otras características del anticuerpo que se sabe que están influidas por la glucosilación de la región constante (por ejemplo semivida).

El hecho de que la glucosilación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos pudiese alterar su capacidad inhibidora sin modificar significativamente su afinidad se confirmó por la observación de que los anticuerpos recombinantes que poseen una mutación puntual en el sitio de glucosilación inhibieron sólo el 40% de la actividad de FVIII. De forma más interesante, el mezclado de las diferentes formas modificadas de mAb-Krix-1 recombinante hizo posible obtener combinaciones con mesetas variables de la inhibición de FVIII, por ejemplo cuando se administran en exceso. En consecuencia, esta estrategia permite la producción de una preparación de FVIII anticoagulante que inhibe FVIII en un intervalo terapéutico muy grande, permitiendo seleccionar la mejor relación entre la acción anticoagulante y los riesgos de hemorragia. La prolongada semivida de los anticuerpos permite obtener estas inhibiciones diana durante un período de tiempo prolongado.

Sin estar limitados por la teoría, la presente invención muestra que la glucosilación de KRIX-1 no cambia significativamente la afinidad por el factor de coagulación diana, y de ese modo no cambia la unión al factor de coagulación diana, lo que demuestra que el mecanismo mediante el cual la glucosilación de KRIX-1 afecta a la actividad inhibidora de KRIX-1 es mediante la alteración de la interacción del factor de coagulación diana con otras proteínas de la cascada de coagulación en un sitio en la región variable. La presente invención incluye un método basado en la modificación del sitio de glucosilación de la región variable de un anticuerpo, que da como resultado una modificación del efecto inhibidor del mencionado anticuerpo sobre la interacción o interacciones del ligando o ligandos reconocidos por un anticuerpo con otras proteínas o reactivos que interaccionan con el mencionado ligando. Se describe además que el efecto inhibidor del anticuerpo sobre el ligando se modifica cambiando el tamaño del anticuerpo sin alterar su actividad por el ligando. Esto se puede lograr produciendo fragmentos del

anticuerpo inhibidor.

La presente invención proporciona así una variedad de anticuerpos y sus fragmentos, que se caracterizan por modificaciones de la glucosilación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos nativos, dando como resultado una modificación de la actividad inhibidora máxima ejercida por los anticuerpos opcionalmente sin alterar significativamente su afinidad o especificidad por su proteína diana. Estos anticuerpos están dirigidos contra el Factor VIII. Adicionalmente, y opcionalmente en combinación con ello, se pueden obtener otras variaciones de actividad inhibidora modificando el tamaño de los anticuerpos, es decir, proporcionando fragmentos de anticuerpos.

Según un aspecto de la presente invención, la modificación de la glucosilación no afecta necesariamente de forma significativa a su afinidad por el antígeno. Más particularmente, según una realización de la presente invención, la afinidad del anticuerpo cambia debido a modificaciones en la glucosilación, de tal manera que la constante de disociación (K_D) del anticuerpo se modifica por un factor menor que 3, lo que se considera como una afinidad sustancialmente no afectada del anticuerpo por el antígeno; preferiblemente, la K_D del anticuerpo se modifica en un factor menor que 2,5, más preferiblemente menor que 2, especialmente de forma preferible menor que 1,5. De este modo, los anticuerpos que tienen sustancialmente la misma afinidad por un antígeno son anticuerpos para los cuales la K_D del anticuerpo difiere en un factor de menos de 2,5, preferiblemente menor que 2, especialmente de forma preferible menor que 1. La afinidad de un anticuerpo por su antígeno se puede medir de diferentes maneras conocidas por la persona experta en la técnica. Según una realización particular de la presente invención, la afinidad del anticuerpo por el antígeno se mide mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales, como se describe aquí. Según una realización particular de la presente invención, la K_D de los anticuerpos modificados al antígeno es menor que $1 \times 10^{-9}M$, preferiblemente menor que $0,5 \times 10^{-9}M$.

De este modo, la presente invención se refiere a anticuerpos con glucosilación modificada, una actividad inhibidora modificada, y una afinidad sustancialmente no afectada por su proteína diana. La presente invención se refiere además al uso de dichos anticuerpos como medicina. La presente invención también se refiere a métodos para preparar tales anticuerpos, a un método para seleccionar tales anticuerpos, y a composiciones farmacéuticas que los comprenden. La presente invención también se refiere a dichos anticuerpos en mezclas con otros anticuerpos, tal como con su anticuerpo nativo.

Como se describe aquí, los anticuerpos se pueden dirigir contra una "proteína que está implicada en un complejo". Las proteínas implicadas en un complejo se pueden definir como proteínas que interactúan con algún otro elemento próximo a su diana durante el comportamiento de su actividad específica. Tales otros elementos pueden ser proteínas, péptidos, fosfolípidos, sales, lípidos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas, etc. Un ejemplo de una proteína implicada en un complejo es el Factor VIII, que interactúa con fosfolípidos y/o el Factor de Von Willebrand al llevar a cabo su actividad (FVIIIa).

En la presente invención, los anticuerpos están dirigidos contra el Factor VIII, más particularmente contra el dominio C1 o C2 del factor VIII, aunque no está limitado a él.

La invención se refiere además al uso de dichos anticuerpos y fragmentos en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de sujetos que sufren cierto trastorno en el que está implicada una proteína (tal como el Factor VII) implicada en un complejo. Tales enfermedades se pueden seleccionar de enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades autoinmunitarias o trastornos relacionados con la inmunología, enfermedades inflamatorias, metabólicas, hematológicas o respiratorias. Se describe aquí el tratamiento de sujetos que sufren un trastorno de la coagulación, más en particular una enfermedad tromboembólica venosa, con dichos anticuerpos. La enfermedad tromboembólica venosa incluye trastornos profundos tales como trombosis de las venas, embolia pulmonar y fibrilación ventricular. Además, se describe aquí un método de tratamiento de trastornos de la coagulación usando dichos anticuerpos. Según una realización específica de la presente invención, los anticuerpos y fragmentos de la presente invención son de uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de septicemia o SIRS.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a anticuerpos o sus fragmentos con una glucosilación modificada y una inhibición máxima modificada, pero una afinidad sustancialmente no afectada hacia su proteína diana. Los anticuerpos se pueden desglucosilar total o parcialmente. En la presente invención, la capacidad inhibidora máxima de los anticuerpos está disminuida. Como alternativa, la actividad inhibidora máxima se reduce reduciendo el tamaño del anticuerpo o fragmento, con la condición de que la afinidad no se vea sustancialmente afectada. En una realización particular de la invención, la capacidad inhibidora de los anticuerpos de la invención es submáxima ($\leq 99\%$), y puede oscilar entre 20% o 99%. Más en particular, la capacidad inhibidora de dichos anticuerpos puede ser 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30% o 20%. La actividad inhibidora de dichos anticuerpos se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica. Para el campo de la coagulación, la actividad inhibidora de, por ejemplo, anticuerpos contra FVIII se puede determinar usando un ensayo de Bethesda.

La presente invención también se refiere a un método para preparar, a partir de un anticuerpo inhibidor (nativo), un anticuerpo modificado con una glucosilación modificada, una capacidad inhibidora modificada y una afinidad sustancialmente similar, caracterizado porque el método comprende las etapas de medir la capacidad inhibidora y la afinidad del anticuerpo nativo, modificar la glucosilación del anticuerpo, y medir nuevamente la capacidad inhibidora y la afinidad del anticuerpo modificado.

La presente invención se refiere además a un método para desarrollar al menos dos anticuerpos inhibidores con una glucosilación diferente, una capacidad inhibidora diferente y una afinidad sustancialmente similar. El método para desarrollar los anticuerpos de la presente invención comienza con la preparación y desarrollo de un anticuerpo inhibidor (nativo) contra una cierta proteína diana. Según una realización particular de la invención, el anticuerpo nativo está dirigido a o se "une" efectivamente a un antígeno próximo al sitio activo de la proteína diana, o a sitios de la proteína importantes para la actividad de la proteína diana. Más particularmente, los anticuerpos se pueden dirigir contra un epítipo situado a una cierta distancia desde un sitio fisiológicamente funcional de la proteína diana (por ejemplo, la unión de la proteína diana a otra proteína de un complejo). Esto se puede lograr mediante inmunización con este epítipo. La selección del anticuerpo se basa en su actividad inhibidora. La siguiente etapa es modificar la glucosilación de la región variable del anticuerpo nativo mediante diferentes métodos (escisión enzimática, adición enzimática de hidratos de carbono, mutaciones, etc.). Opcionalmente, esto se lleva a cabo teniendo en cuenta la accesibilidad del sitio de glucosilación y la interacción con el antígeno. Como alternativa, la selección se basa en la afinidad no afectada y en la actividad inhibidora modificada en comparación con el anticuerpo nativo (o en comparación entre sí).

En una realización particular de la presente invención, se proporciona una librería de al menos dos anticuerpos dirigidos contra FVIII con una glucosilación diferente en la región variable, una capacidad inhibidora diferente y una afinidad sustancialmente similar. De este modo, la invención se refiere a la producción de un anticuerpo modificado de un anticuerpo nativo inhibidor con una capacidad inhibidora modificada y una afinidad, la cual no se ve sustancialmente afectada en comparación con el anticuerpo nativo, pero con una capacidad inhibidora modificada. En una realización particular de la invención, dicho anticuerpo modificado (para uso en dicha librería) se obtiene produciendo el anticuerpo nativo como un anticuerpo recombinante en células hospedantes adecuadas, tales como células CHO. Como alternativa, dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se prepara mediante mutagénesis dirigida al sitio, más en particular dicho anticuerpo no tiene ningún sitio de N-glucosilación en la región variable. En otra alternativa, dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se prepara exponiendo anticuerpos a enzimas que escinden hidratos de carbono. En todavía otra realización, dicho fragmento o fragmento de anticuerpo se produce mediante síntesis química. Según una realización particular, dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene una capacidad inhibidora del factor VIII entre 20% y 90%, más en particular entre 30% y 80%, aún más en particular entre 40% y 70%, y todavía más en particular entre 50% y 60%, o cualquier combinación de las mismas.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo modificado dirigido contra el Factor VIII se produce mediante una estirpe celular denominada Krix-1, o mediante una estirpe celular que produce anticuerpos con las mismas características. En una realización más particular, dicho anticuerpo deriva de un anticuerpo nativo que es Krix-1 o un fragmento del mismo o un análogo producido recombinantemente de un Krix-1 modificado, más en particular, dicho anticuerpo tiene una similitud de aminoácidos de al menos 80%, preferiblemente al menos 90% con Krix-1 o un fragmento del mismo. En todavía una realización más particular de la presente invención, dicho anticuerpo es el anticuerpo recombinante Krix-1 o un fragmento del mismo, producido en células CHO, y con una actividad inhibidora de alrededor de 84%. La eliminación de la glucosilación de Krix-1 en Asn47 en la secuencia de glucosilación de consenso Asn47-X-Thr49-Y se puede lograr de varias maneras. La mutación de Asn47 a cualquier aminoácido, o la mutación de Thr49 a cualquier aminoácido diferente de serina, dará como resultado la ausencia de glucosilación. La mutación Thr49Ser puede no tener ningún efecto sobre la glucosilación, pero también podría dar como resultado un patrón de glucosilación modificado o incluso la ausencia de glucosilación, ya que no todo sitio de glucosilación de consenso potencial que aparece en una secuencia proteica está también glucosilado efectivamente en la proteína expresada. Como alternativa, la mutación del aminoácido en la posición 48 ó 50 en prolina evitará la glucosilación, pero además puede provocar la distorsión local de la estructura terciaria del anticuerpo. En todavía una realización más particular, dicho anticuerpo es un mutante de Krix-1 con posiciones mutadas Asn47 a Thr49, más en particular con Asn47 cambiado en Gln47 (KRIX-1Q), Glu47 (KRIX-1E) o Asp47 (KRIX-1D) y/o Thr49 en Ala49 (KRIX-1A). La presente invención también se refiere a anticuerpos derivados de Krix-1 incubando el anticuerpo nativo con enzimas que escinden hidratos de carbono, tales como N-glucosidasa-F, más particularmente anticuerpos obtenidos de esta manera y con una actividad inhibidora de alrededor de 50%. Los anticuerpos derivados de Krix-1 pueden tener una actividad inhibidora de al menos 20%, más particularmente al menos 40%, 50% o 80%.

Cuando se usan fragmentos que son expresados por tecnología recombinante (por ejemplo fragmentos scFv), se pueden obtener formas desglucosiladas mediante expresión de una proteína que comprende la secuencia de consenso de glucosilación en una cepa de levadura eficiente en la glucosilación, o mediante expresión en bacterias que no realizan glucosilación en absoluto.

Estos anticuerpos y sus fragmentos que poseen glucosilación modificada en la región variable, opcionalmente en o en la proximidad de una CDR, tienen las propiedades ventajosas de que muestran actividad inhibidora máxima terapéuticamente útil diferente del anticuerpo nativo, mientras que inactivan la proteína diana sólo parcialmente incluso cuando el anticuerpo está en un exceso molar, como el anticuerpo nativo. Estos anticuerpos modificados en los glucanos y sus fragmentos son por lo tanto útiles como agentes para obtener sólo una inhibición parcial de una proteína diana, más en particular como agentes anticoagulantes que permiten lograr la inhibición parcial deseable de un factor de coagulación fuera del alcance del anticuerpo nativo en el caso de un anticuerpo dirigido contra un elemento en el sistema de coagulación. De forma similar, se pueden usar fragmentos no modificados, que tienen la misma afinidad que el anticuerpo intacto, pero una menor actividad inhibidora, en combinación con los anticuerpos

intactos opcionalmente modificados, para obtener una mezcla que asegure una inhibición particular. De este modo, la presente invención permite, mediante selección o desarrollo de un anticuerpo con una capacidad inhibidora particular, la formulación de un medicamento para controlar la coagulación de una manera bien definida.

5 El hecho de que la afinidad de los anticuerpos modificados de la invención no cambie significativamente es además de valor crítico para su uso en mezclas, y significa que los anticuerpos modificados desplazarán, de forma similar al anticuerpo nativo, el ligando natural. Esto permite la formulación de mezclas de anticuerpos a fin de obtener una actividad inhibidora bien definida. Más particularmente, esto es de interés en el campo de anticuerpos anticoagulantes, en los que la actividad inhibidora máxima puede ser crítica. Por ejemplo, en algunos marcos clínicos, se podrían requerir anticuerpos anti-FVIII con diferentes actividades inhibidoras. Por ejemplo, la profilaxis a
10 corto plazo de la trombosis tras la intervención quirúrgica se puede tratar óptimamente con fármacos con una potencia diferente de aquellos requeridos para el tratamiento de una afección crónica tal como fibrilación ventricular.

De este modo, según una realización particular de la presente invención, el anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo se usa en una mezcla con otros anticuerpos dirigidos contra la misma proteína diana, aún más en particular dirigidos contra el mismo antígeno o derivados de la misma estirpe celular. Esta mezcla puede comprender los anticuerpos nativos junto con anticuerpos modificados dirigidos contra la misma proteína diana, o la mezcla puede contener dos anticuerpos modificados de diferente manera en su patrón de glucosilación. Las diferentes partes de la mezcla se pueden mezclar en cantidades tales para que se pueda obtener cualquier actividad inhibidora deseada.

La presente invención se refiere a un método para preparar anticuerpos con una glucosilación modificada y una inhibición máxima modificada, pero sin una afinidad o especificidad alterada por su proteína diana. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para producir dichos anticuerpos, que comprende la etapa de exponer anticuerpos a enzimas que escinden o que transforman hidratos de carbono. Como alternativa, el método de preparación de la presente invención comprende la etapa de producir los anticuerpos en estirpes celulares con enzimas de glucosilación adecuadas, o modificando las condiciones del cultivo celular para modificar la actividad de las enzimas de glucosilación de la estirpe celular que produce los anticuerpos. En otra realización de la presente invención, el método para preparar dichos anticuerpos comprende la etapa de modificar genéticamente el sitio de unión a antígeno del anticuerpo, a fin de eliminar o introducir sitios de glucosilación, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida al sitio.

En la presente invención, la glucosilación del anticuerpo se modifica en su región variable.

30 De este modo, la presente invención se refiere a anticuerpos que tienen un patrón de glucosilación modificado con respecto al anticuerpo nativo.

El anticuerpo nativo se puede preparar según métodos conocidos en la técnica.

Los datos iniciales sobre anticuerpos intactos que son expresados en diferentes estirpes celulares, sobre anticuerpos intactos que son tratados con enzimas desglucosilantes, y sobre mutagénesis dirigida al sitio del sitio de consenso de glucosilación muestran que el efecto inhibidor de tal anticuerpo está correlacionado con el tamaño de la glucosilación. La presente invención presenta el concepto de que, para anticuerpos inhibidores tales como Krix-1, el efecto inhibidor del anticuerpo disminuye con el tamaño tridimensional. Este concepto se confirma mediante el uso de fragmentos Fab y fragmentos scFv de Krix-1, que tienen menores niveles inhibidores que el anticuerpo intacto.

La presente invención muestra además que mezclas de anticuerpos inhibidores, que derivan del mismo anticuerpo intacto nativo, con diferente actividad inhibidora individual, dan como resultado la mezcla en la que se obtiene una actividad inhibidora intermedia. Esto es igualmente aplicable para mezclas de diferentes anticuerpos nativos e intactos que son competitivos entre sí, tal como una mezcla del anticuerpo monoclonal Krix-1 (primer anticuerpo) y un segundo anticuerpo monoclonal obtenido a partir de la estirpe celular RHD5.

Aún otro aspecto de la invención proporciona métodos para aislar anticuerpos inhibidores adicionales que se pueden usar según la presente invención, basándose en su capacidad para competir con un anticuerpo inhibidor conocido, tal como Krix-1. La presente invención proporciona así métodos y herramientas para identificar, partiendo de Krix-1, anticuerpos adicionales que compiten con la unión de Krix-1. Tal anticuerpo es aquel que es opcionalmente inhibidor, y que opcionalmente tiene además un efecto de meseta. El montaje experimental de tal método se describe en el ejemplo 13.

Los anticuerpos monoclonales contra una cierta proteína diana se pueden producir mediante una técnica que proporciona la producción de moléculas de anticuerpos mediante estirpes celulares continuas en cultivos, tal como la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Kohler y Milstein (1975) Nature 256, 495-497), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4, 72), la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al. (1985) en "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. p. 77-96) y similar. Los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano y ratón (u otra especie), o incluso de cualquier otro tipo conocido en la técnica, tal como los procedentes de camellos o llamas. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden obtener a partir de cualesquiera técnicas conocidas en la técnica

(por ejemplo Teng et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 7308 - 7312; Kozbor et al. (1983), Immunol. Today 4, 72-79, Olsson et al. (1982) Methods. Enzymol. 92, 3-16). Se pueden preparar moléculas de anticuerpos quiméricas que contienen un dominio de unión a antígeno de ratón con regiones constantes humanas (Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 6851; Takeda et al. (1985) Nature 314, 452).

5 Se pueden usar diversos procedimientos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales para epítomos de las proteínas dianas. Para la producción de anticuerpo, se pueden inmunizar diversos animales huéspedes mediante inyección con una proteína específica, o un fragmento o derivado de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, conejos, ratones y ratas. Para incrementar la respuesta inmunológica, se pueden usar diversos adyuvantes, dependiendo de la especie hospedante, e incluyendo, pero sin limitarse a, de Freund (completo e
10 incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenoles, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (Bacilo Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum.

Un clon molecular de un anticuerpo para un epítipo proteico seleccionado se puede preparar mediante técnicas conocidas. Para construir secuencias de ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo monoclonal, o
15 región de unión a antígeno de la misma, se puede usar la metodología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

La presente invención proporciona moléculas de anticuerpos así como fragmentos de tales moléculas de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos, que contienen el idiotipo de la molécula, se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, el fragmento F(ab')₂, que se puede
20 producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, los fragmentos Fab', que se pueden generar reduciendo los puentes de disulfuro del fragmento F(ab')₂, y los fragmentos Fab, que se pueden generar tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor. Las moléculas de anticuerpos se pueden purificar mediante técnicas conocidas, por ejemplo inmuoabsorción o cromatografía de inmuoafinidad, métodos cromatográficos tales como HPLC (cromatografía de líquidos de altas prestaciones), o una combinación de los
25 mismos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante técnicas de hibridoma convencionales, presentación de fagos, librerías combinatorias, reordenación de cadenas inmunoglobulínicas, mutagénesis dirigida al sitio, y técnicas de humanización para generar nuevos anticuerpos con afinidad inhibitoria máxima limitada.

Se describen además anticuerpos modificados derivados de anticuerpos monoclonales nativos que se producen mediante inmunización a propósito en animales, preferiblemente en ratón, por ejemplo inyectando el Factor VIII humano en ratones y después fusionando los linfocitos del bazo con una estirpe celular de mieloma de ratón, seguido de la identificación y clonación de los cultivos celulares que producen anticuerpos anti-factor VIII, como se describe adicionalmente en los documentos WO97/26010 y/o WO 01/04269. Más particularmente, para la
30 inmunización se pueden usar epítomos del antígeno que flanquean el sitio "activo" o "interactivo" (por ejemplo que se une con otros factores de un complejo) de dicho antígeno, a fin de promover el desarrollo de anticuerpos en los que el efecto inhibitorio del anticuerpo no está ligado directamente a la unión del antígeno a través de la CDR.

Un aspecto de la presente invención proporciona anticuerpos que se modifican en su patrón de glucosilación. La modificación de la glucosilación de anticuerpos nativos se puede obtener mediante diferentes métodos conocidos en la técnica. La modificación del patrón de glucosilación en el sitio de unión a antígeno de los anticuerpos de la presente invención se puede lograr mediante tratamiento enzimático de anticuerpos purificados. Como alternativa, la modificación de los glucanos de los anticuerpos de la presente invención se puede lograr produciendo los anticuerpos en estirpes celulares con enzimas de glucosilación adecuadas, o modificando las condiciones del cultivo celular para modificar la actividad de las enzimas de glucosilación de la estirpe celular que produce los anticuerpos. Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención también se pueden producir modificando genéticamente el sitio de unión a antígeno del anticuerpo, a fin de eliminar o introducir sitios de glucosilación.
45

A fin de modificar el patrón de glucosilación de un anticuerpo nativo, se pueden aplicar muchas enzimas que escinden o transfieren hidratos de carbono. La glucosilación se puede disminuir completa o parcialmente, y la modificación se obtiene en la región de unión a antígeno del anticuerpo. Las enzimas se pueden aplicar en un anticuerpo nativo en diferente orden y en circunstancias variables (concentraciones, tiempo, temperatura, tampón, etc.), a fin de obtener anticuerpos con diferentes patrones de glucosilación.
50

Se pueden usar enzimas tales como el péptido N-4(N-acetil-beta-glucosaminil)asparagina amidasa F (PNGasa F), también denominada N-glucosidasa F. Esta enzima tiene una amplia especificidad, y libera casi toda la cadena de oligosacárido enlazada mediante N a partir de las proteínas (Plummer TH Jr et al. (1984) J Biol Chem. 259, 10700-10704). Esta enzima libera cadenas tetra- y pentaantennarias. Es digno de atención que la actividad de la enzima sólo se puede predecir cuando la glucoproteína está completamente desnaturalizada. En consecuencia, la actividad de la enzima sobre un anticuerpo intacto se debe de controlar en cada caso. En Current Protocols in Protein Science, Ed. G. Taylor, Unidad 12.4; John Wiley & Sons, Inc., se describen métodos para controlar la desglucosilación del anticuerpo.
55

En particular, los anticuerpos glucosilados y desglucosilados se comparan mediante isoelectroenfoque.

Las glucoformas truncadas de IgG se pueden generar mediante tratamiento enzimático secuencial como se describe en Mimura et al. (2001) J Biol Chem. 276, 45539-45547, y se resume en la Figura 1 y 2.

5 Los ácidos siálicos son los azúcares terminales en muchos oligosacáridos enlazados mediante N y O. Para eliminar ácido siálico, la IgG nativa en tampón de acetato, pH 5,0, se expone a sialidasa (tal como la sialidasa procedente de *Arthrobacter ureafaciens*, Roche Molecular Diagnostics, East Sussex, UK) a 37°C durante 24 h. La eliminación de ácidos siálicos da como resultado un incremento en el punto isoelectrónico de la proteína. Por lo tanto, IEF se puede usar para controlar la eliminación de ácidos siálicos. Con la eliminación de ácidos siálicos, la galactosa se puede eliminar mediante tratamiento con beta-galactosidasa (*Diplococcus pneumoniae*, Roche Molecular Biologicals) en 10 tampón de acetato, a 37°C durante 24 h. Tras la eliminación de ácido siálico y galactosa, la N-acetilglucosamina se puede escindir mediante tratamiento con N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (*D. pneumoniae*, Roche, Molecular Biochemicals) en 37°C durante 24 h. Entonces, los restos de manosa se pueden eliminar mediante tratamiento con α -manosidasa (canavalia, Glyko, Oxfordshire, UK) a 37°C durante 48 h (Mimura Y. et al. citado más arriba).

15 También se han descrito diferentes tipos de sialidasa. La sialidasa (neuraminidasa) de *Arthrobacter ureafaciens* libera ácidos siálicos enlazados tanto mediante alfa 2,3 como alfa 2,6, mientras que la sialidasa del virus de la enfermedad de Newcastle libera sólo ácidos siálicos enlazados mediante alfa 2,3 (Jassal et al. (2001) Biochem Biophys Res Comm. 286: 243-249). La endoglucosidasa F2 escinde la unión entre los dos restos GlcNAc en la región central, dejando una GlcNAc todavía unida a la proteína. La endoglucosidasa F2 libera preferentemente 20 cadenas de oligosacáridos de tipo complejo biantenarias a partir de glucoproteínas, pero no escinde cadenas tri- o tetraantenarias.

La endoglucosidasa F3 es otra endoglucosidasa con un intervalo estrecho de sustratos: escinde cadenas triantenarias. Una cadena biantenaria fucosilada central es el único sustrato demostrado adicional. No escinde cadenas biantenarias o tetraantenarias no fucosiladas híbridas con contenido elevado de manosa. Todos los enlaces que se pueden escindir mediante endoglucosidasa F2 y F3 no están expuestos en un anticuerpo maduro. Los métodos adecuados para determinar si un anticuerpo se puede modificar de forma útil mediante estas endoglucosidasas incluyen SDS-PAGE, métodos de unión a lectina usando aglutinina-1 de *Ricinus communis* e IEF como se describe anteriormente.

25 En cambio, los restos de glucano se pueden añadir enzimáticamente a hidrato de carbono expresado en la parte variable del anticuerpo. Por ejemplo, el tratamiento con sialidasa como se describe anteriormente puede ser seguido por tratamiento con galactosil-transferasa y UDP-Gal en un tampón adecuado (Krapp et al. (2003) J Mol Biol. 325, 979-989). Los anticuerpos modificados son entonces homogéneos para la galactosilación de la cadena de hidrato de carbono (glucoforma digalactosilada biantenaria).

30 La purificación de anticuerpos que poseen diferentes oligosacáridos es también conocida por las personas expertas en la técnica. Los anticuerpos que poseen diferentes oligosacáridos se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad con lectina, tal como concanavalina A (que se une a una GlcNAc bisecante). Aleuria aurantia diferencia en base a la fucosilación central. La aglutinina 1 de *Ricinus communis* fracciona según el número de restos de galactosa, debido a que esta lectina muestra afinidad específica por oligosacáridos que terminan con galactosa (Youings et al. (1996) Biochem J. 314, 621).

35 Todos los restos de hidrato de carbono no están expuestos en un anticuerpo maduro. Los métodos adecuados para determinar si un anticuerpo se puede purificar positiva o negativamente de forma útil usando la lectina anterior son bien conocidos por los expertos en la técnica. El anticuerpo no unido se puede ensayar para determinar su actividad inhibitoria sobre FVIII usando el método de Bethesda (Kasper et al. (1975) Thromb Diath Haemorrh 34, 612). De forma similar, la actividad del anticuerpo capturado en la columna y eluido usando un tampón adecuado se puede ensayar usando el método de Bethesda (citado más arriba).

40 Un método alternativo para modificar la glucosilación de un anticuerpo es generar anticuerpos recombinantes con un patrón de glucosilación modificado produciendo anticuerpos recombinantes en estirpes celulares seleccionadas como una función de su repertorio de enzimas de glucosilación. Ejemplo de tal estirpe celular son las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) bien conocidas.

45 Aunque las células CHO tienen la mayoría del repertorio humano de enzimas de glucosilación, carecen en particular de glucosiltransferasas. En particular, el gen alfa 2,6-sialil-transferasa (1,2) no es expresado endógenamente en células CHO. Esta enzima añade azúcares de galactosa terminales con ácido siálico en la posición alfa-2,6 en la secuencia Gal beta 1, 4GlcNAc-R. Sin embargo, las células CHO expresan una alfa 2,3-sialil-transferasa funcional de manera que los ácidos siálicos terminales están en enlace alfa-2,3 con respecto a galactosa. La alfa-3/4 fucosiltransferasa tampoco es sintetizada por estas células (Grabenhorst et al. (1999) Glycoconj. J. 16, 81).

50 Otro método para producir anticuerpo recombinante con un patrón de glucosilación modificado es usar una estirpe celular genéticamente modificada para expresar enzima de glucosilación a partir de otras cepas. En particular, se puede usar una estirpe celular CHO-K1 transfectada con un gen de alfa 2,6-sialiltransferasa clonado a partir de otra cepa (citado más arriba).

Cualquier sistema de expresión es potencialmente adecuado para la generación de anticuerpo recombinante con patrón de glucosilación modificado, tal como levadura (por ejemplo *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*), células de insectos (expresión en baculovirus), células vegetales o plantas, o células de mamíferos. Para la expresión de fragmentos de un anticuerpo, la expresión en levadura proporciona una alternativa para la expresión de células de insectos o de mamíferos. Si no se necesita glucosilación en absoluto, se considera la expresión en bacterias.

Con respecto a levaduras, se informó que la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se une a una media de 8 a 14 unidades de manosa, es decir, Man(8-14)GlcNAc(2) por sitio de glucosilación (Tschopp en el documento EP0256421), y aproximadamente el 85% de los oligosacáridos enlazados mediante N están en el intervalo de tamaños Man(8-14)GlcNAc(2) (Grinna y Tschopp (1989) *Yeast* 5, 107-115). *Aspergillus niger* añade Man(5-10)GlcNAc(2) a sitios de N-glucosilación (Panchal Wodzinski (1998) *Prep Biochem Biotechnol.* 28, 201-217). El mutante *mnn9* deficiente en la glucosilación de *Saccharomyces cerevisiae* difiere de *S. cerevisiae* de tipo salvaje por cuanto las células *mnn9* producen proteínas glucosiladas con un oligosacárido modificado que consiste en Man(9-13)GlcNAc(2) en lugar de proteínas hiperglucosiladas (Mackay et al. en la patente U.S. n° 5.135.854). Sin embargo, la presencia de restos de manosa terminales enlazados mediante alfa-1,3 es característico para oligosacáridos centrales de *S. cerevisiae* (tipo salvaje y mutante *mnn9*) (Montesino et al. (1998) *Protein Expr Purif.* 14, 197-207). Los oligosacáridos unidos a sitios de N-glucosilación de proteínas expresadas en *P. pastoris* o *S. cerevisiae* *och1mnn1* están desprovistos de tales manosas terminales enlazadas mediante alfa-1,3 (Gellissen et al. (2000) *Appl Microbiol Biotechnol.* 54, 741-750). Se considera que las manosas terminales enlazadas mediante alfa-1,3 son alergénicas (Jenkins et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14, 975-981). Por lo tanto, es probable que las proteínas que poseen en sus oligosacáridos restos de manosa terminales enlazados mediante alfa-1,3 no sean adecuadas para fines de diagnóstico o terapéuticos.

El repertorio de enzimas glucosilantes difiere de un tipo celular a otro. A fin de obtener un patrón de glucosilación deseado, se puede (sobre)expresar una o más enzimas glucosilantes mediante transfección transitoria o estable. Igualmente, una o más enzimas glucosilantes se puede inhibir (inactivación génica) temporalmente (por ejemplo mediante tecnología antisentido o siRNA) o permanentemente. En ciertas realizaciones, se usan células de levadura, que tienen un repertorio limitado de enzimas implicadas en la glucosilación. Aquí, se puede introducir uno o más genes humanos implicados en la glucosilación para obtener un patrón de glucosilación deseado.

Generalmente, la glucosilación mejora a menudo la solubilidad de una proteína. En ciertas realizaciones, es ventajoso expresar una proteína recombinante con una amplia glucosilación (y buena solubilidad), y tratar después la proteína recombinante con enzimas desglucosilantes.

En ciertas realizaciones, es ventajoso expresar proteínas recombinantes con una señal de secreción (escindible) que dirige la proteína en el medio de crecimiento. Por ejemplo, este es el caso para células de levadura que son difíciles de lisar. Además, la proteína recombinante puede tener una etiqueta (por ejemplo etiqueta de His) o un dominio adicional, a fin de facilitar la purificación. Tal etiqueta o dominio también puede ser escindible (por ejemplo mediante trombina o mediante el factor X).

En una realización particular de la invención, la actividad inhibidora del Factor VIII del anticuerpo recombinante producido en cualquiera de estos sistemas de expresión se puede evaluar entonces en el ensayo de Bethesda usando la modificación del método de Nijmegen como se describe anteriormente.

Además, también se pueden aprovechar las condiciones de cultivo para modificar la glucosilación del anticuerpo recombinante. La concentración de oxígeno disuelto en estado estacionario en cultivo libre de suero tiene un efecto sobre la glucosilación del anticuerpo. El grado de galactosilación se reduce con concentraciones reducidas de oxígeno disuelto (Kunkel et al. (1998) *J Biotechnol.* 62, 55-71). La suplementación del medio con más de 20 mM de N-acetilglucosamina también puede inducir a nuevas glucoformas de anticuerpo (Tachibana et al. (1992) *Biochem Biophys Res Commun.* 189, 625-32; Tachibana et al. (1996) *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 32, 178-183). Las hormonas glucocorticoides y la interleucina 6 están implicadas en la modulación de la glucosilación de proteínas (Canella y Margni (2002) *Hybrid Hybridomics* 21, 203). Otros factores que influyen en la glucosilación son los cambios en el pH del medio de cultivo, y la disponibilidad de precursores y nutrientes.

Por lo tanto, la selección de la estirpe celular y de las condiciones del cultivo celular pueden tener una gran influencia sobre el patrón de glucosilación.

Otra alternativa a las modificaciones enzimáticas y a la producción recombinante de los anticuerpos es usar mutagénesis (dirigida al sitio). Con esta técnica, se pueden introducir nuevos sitios de glucosilación, o se pueden eliminar los sitios de glucosilación existentes. Los sitios de N-glucosilación se pueden introducir mediante mutagénesis dirigida al sitio en la región variable del anticuerpo. Preferiblemente, las mutaciones se introducen como cambios de aminoácidos individuales, para minimizar el efecto de la sustitución de aminoácidos sobre la afinidad del anticuerpo por el antígeno. La adición de un sitio de N-glucosilación se lleva a cabo mediante creación de una secuencia Asn-X-Ser/Thr, lo más habitualmente mutando un codón para codificar Asn. Además, es preferible que los sitios para la glucosilación adicional se seleccionen en posiciones que se predice que son accesibles a glucosiltransferasas. Como alternativa, tramos de aminoácidos que contienen sitios de N-glucosilación se pueden seleccionar en las secuencias publicadas de anticuerpos glucosilados en la región variable. La selección de

anticuerpos que inhiben la actividad de FVIII de manera deseable se puede hacer usando el ensayo de Bethesda (Kasper et al. (1975) citado más arriba). La estructura proteica también se puede modificar para modificar indirectamente la glucosilación (Lund et al. (1996) *J Immunol.* 157, 4963, Lund et al. (2000), *Eur J Biochem.* 267, 7246). La mutagénesis dirigida al sitio es un método bien conocido por la persona experta en la técnica, e incluye el método de Zoller y Smith (Zoller y Smith (1987) *Methods Enzymol.* 154:329-50).

La presente invención también proporciona fragmentos de cualquiera de los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, CDR's, dominios variables individuales así como derivados, homólogos y combinaciones de estos.

Los anticuerpos de la presente invención se dirigen contra el Factor VIII.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a anticuerpos derivados de Krix-I, más en particular anticuerpos modificados en su patrón de glucosilación derivados de Krix-I y con una actividad inhibitora del factor VIII modificada. Particularmente, los anticuerpos modificados en los glucanos se derivan del anticuerpo monoclonal humano Krix-1, sus fragmentos, o contiene una o varias regiones determinantes de la complementariedad del mismo. Los anticuerpos ejemplares con sitio de glucosilación modificado son anticuerpos producidos mediante tratamiento de Krix-1 con N-glucosidasa F. Son particularmente anticuerpos genéticamente modificados que contienen las mutaciones Asn47Glu (Krix-1 E) y Thr49Ala (Krix-1A) en la CDR1 de la cadena pesada de Krix-1.

La modificación de la glucosilación modifica la actividad inhibitora del Factor VIII de mAb-Krix-1. Un método particular para evaluar la actividad inhibitora de un anticuerpo con patrón de glucosilación modificado es el ensayo de Bethesda (Kasper et al. (1975), citado más arriba), que usa la modificación del método de Nijmegen (Verbruggen et al. (1995) *Thromb Haemost.* 73, 247-251). En este ensayo, se mezcla plasma reunido normal, usado como fuente de FVIII, con un volumen igual de anticuerpo. Después de una incubación de 2 h con anticuerpo, la actividad residual de FVIII se mide mediante un ensayo cromogénico o de coagulación del Factor.

La estirpe celular denominada Krix-1 se describió en el documento WO 01/04269 y se depositó en BCCM/LMBP (Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection Laboratorium voor Moleculaire Biologie, Universidad de Gante K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gante, BE, con el número de acceso LMBP 5089CB el 1 de julio de 1999, por Dr. Marc Jacquemin, Center for Molecular and Vascular Biology, Onderwijs & Navorsing, Herestraat 49, 3000 Leuven, Bélgica.

Por inhibición parcial de la actividad de FVIII, se quiere decir que la inhibición máxima de la actividad del Factor VIII por un cierto anticuerpo es menor o igual a 99%, según se determina usando un método de ensayo adecuado, tal como el ensayo de Bethesda. La actividad del Factor VIII residual se mide entonces usando un ensayo de coagulación o un ensayo cromogénico del Factor VIII. Un ensayo cromogénico adecuado es, por ejemplo, el Coatest^R (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Italia).

Los anticuerpos descritos en esta invención pueden ser útiles en la terapia o prevención de diferentes enfermedades. Los anticuerpos, que se dirigen contra un elemento del sistema de coagulación, son útiles en composiciones terapéuticas y farmacéuticas para trastornos trombóticos asociados con infarto de miocardio, angina inestable, fibrilación ventricular, apoplejía, daño renal, embolia pulmonar, trombosis de venas profundas, angioplastia coronaria transluminal percutánea, coagulación intravascular diseminada, septicemia, trasplantes, anastomosis.

La presente invención permite la generación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento y prevención de trastornos o síndromes en los que por un lado se desea la inhibición del Factor VIII pero en los que por otro lado es beneficioso un cierto nivel de actividad remanente del Factor VIII en el tratamiento o prevención de dichos trastornos o síndromes. Un ejemplo de esto es la inflamación sistémica, que es el punto final posible de un número de afecciones clínicas, incluyendo pancreatitis, isquemia, trauma múltiple y lesión tisular, choque hemorrágico, lesión de órganos mediada por el sistema inmunitario, e infección. Puesto que se observan cambios patológicos bastante comparables en la inflamación sistémica independientemente de la causa inicial, la expresión "síndrome de respuesta inflamatoria sistémica" (en lo sucesivo denominado aquí SIRS) se ha citado normalmente para dar cuenta de tales cambios y se usa por lo tanto en la presente solicitud según las recomendaciones del American College of Chest Physicians según se formula por R.C. Bone et al. en *Chest* (1992) 101,1644-1655. La definición y etiología de SIRS se describe también en Nyström (1998) *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Supl. A, 1-7. La septicemia representa un SIRS asociado a infección. El choque, ya sea de origen séptico o no, se caracteriza principalmente por (a) hipotensión que persiste a pesar de la reposición adecuada de fluidos, y (b) anomalías relacionadas con hipoperfusión o disfunción orgánica.

Según Bone et al. en *Chest* (1997) 112, 235-43, la inflamación sistémica temprana, que es una parte integral de SIRS, se compensa normalmente mediante una respuesta antiinflamatoria posterior. Un equilibrio entre sucesos proinflamatorios y antiinflamatorios conduce a un resultado clínico favorable. Sin embargo, el balance entre estos dos sucesos antagónicos es frágil y se destruye fácilmente, puesto que están implicados muchos mediadores que interaccionan. En años recientes se ha acumulado mucho conocimiento sobre la patofisiología de SIRS y el desarrollo de choque séptico relacionado, cuyo paradigma es debido a infección con microorganismos gram (-). De este modo, las endotoxinas liberadas por tales microorganismos activan un número de células huésped, y en

particular monocitos y macrófagos. Esto da como resultado la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo factor de necrosis tumoral (en lo sucesivo denominado aquí TNF), interleucinas 1, 6 y 8 (en lo sucesivo denominadas IL-1, IL-6 e IL-8). Las enzimas producidas por las mismas células conducen a la activación de los sistemas de coagulación, del complemento y de bradicinina. Según Parillo et al., en *Ann. Intern. Med.* (1990) 113, 227-242, se producen radicales superóxido y metabolitos de ácido araquidónico, incluyendo factor activador de plaquetas (denominado aquí en lo sucesivo PAF).

La activación del sistema de coagulación, junto con la adhesión de células polimorfonucleares y plaquetas al endotelio vascular, es esencial en la patogénesis de SIRS, puesto que da como resultado la formación de trombo en la microvasculatura. Los trombos afectan a la perfusión orgánica, lo que termina con la disfunción o insuficiencia orgánica. A nivel intestinal, esto produce una mayor absorción de endotoxinas a partir de la flora bacteriana, que estimula adicionalmente la liberación de citocinas proinflamatorias y disfunción orgánica. Por lo tanto, la coagulación intravascular diseminada (denominada en lo sucesivo aquí DIC) es un componente esencial en la patofisiología de la septicemia y del choque séptico.

Posteriormente surge una respuesta antiinflamatoria compensadora, de la que depende el resultado clínico de la septicemia. Respuestas demasiado débiles o demasiado fuertes pueden agravar la situación clínica por fracaso a la hora de controlar DIC, o por conducir a una hemorragia descontrolada y a una supresión inmunitaria con una mayor susceptibilidad a infección posterior. Los factores individuales que intervienen en esta fase antiinflamatoria no están todos identificados con certeza, pero cierto número de moléculas se han visto claramente implicadas. De este modo, los niveles de antitrombina (en lo sucesivo denominada aquí AT, un inhibidor de serina proteasa plasmática con una concentración plasmática normal de 3 μ moles/l), proteína C activada (APC) e inhibidor de la ruta del factor tisular (denominado aquí en lo sucesivo TFPI, otra proteína unida al endotelio), tres inhibidores potentes que actúan en diversas etapas en la cascada de la coagulación, se reducen seriamente durante la septicemia, y sus concentraciones plasmáticas están inversamente correlacionadas con el pronóstico clínico adverso según E.F. Mammen en *Intensive Care Med.* (1998) 24, 649-50. Tales niveles reducidos se deben tanto a un mayor consumo como a una síntesis reducida, a saber, por el hígado.

El sistema de coagulación está dividido actualmente en una fase de iniciación, una fase de amplificación y una fase efectiva. La iniciación se produce por activación del factor VII sobre el factor tisular (TF), o por el contacto con el factor XII. Esto da como resultado la generación de pequeñas cantidades de trombina, que activa un bucle de amplificación que conduce a más formación de trombina. En este bucle de amplificación se activan dos cofactores, el factor V y el factor VIII, siendo su función incrementar en varios logaritmos de magnitud la escisión de protrombina y factor X, respectivamente. La fase efectiva de la cascada de la coagulación conduce eventualmente a la formación de fibrina y la retracción del coágulo. Por lo tanto, la trombina ocupa un papel central en el desarrollo de DIC asociada con septicemia o SIRS de otro origen. Este descubrimiento ha conducido a intentos terapéuticos para reducir la formación de trombina. En seres humanos, estudios que comparan antitrombina con un inhibidor de proteasa sintética (Maki et al. en *Gynecol. Obstet. Invest.* (1987) 23:230-240) o heparina (Blauhut et al. en *Thromb. Res.* (1985) 39:81-89) documentaron una atenuación significativa de la coagulación intravascular diseminada después del tratamiento con antitrombina, pero ninguno incluyó un grupo de control con placebo. Según Fourrier et al. en *DIC, Excerpta Medica, Amsterdam* (1993) 221-226, un ensayo bienmascarado controlado con placebo en pacientes con choque séptico y tratamiento de DIC con un concentrado plasmático de antitrombina logró una corrección significativamente temprana de DIC, pero no logró disminuir la mortalidad de manera significativa. Más recientemente, se ha ensayado AT recombinante o derivada de plasma en el control de septicemia, concretamente según Eisele et al. en *Intensive Care Med.* (1998) 24:663-72. Sin embargo, todas estas realizaciones encontraron serios problemas. La antitrombina plasmática natural es un inhibidor de trombina relativamente pobre (logra una inhibición total de trombina, pero sólo a concentraciones muy elevadas), pero su efecto inhibidor aumenta 10.000 veces en presencia de heparina. Son necesarias concentraciones elevadas de antitrombina para prevenir choque en modelos de animales de septicemia, según Büller et al. en *Am. J. Med.* (1989) 87:44-48 y Vinazzer en *Clin. Appl. Thromb/Hemost.* (1995) 1:62-65. Debido al tiempo de supervivencia moderado de la antitrombina en la circulación (se dio a conocer una semivida de alrededor de 3 días por Schwartz et al. en *Am. J. Med.* (1989) 87:53-60 y Menache et al. en *Blood* (1990) 75:33-39) y a su consumo de SIRS, su actividad se debería de monitorizar de forma regular. Teóricamente, la terapia combinada de antitrombina y heparina debería ser más eficaz que la antitrombina sola en el manejo de choque, pero desafortunadamente esta forma de tratamiento no mejoró el resultado en pacientes que sufrieron un choque, y se asoció con un mayor riesgo de hemorragia.

La cantidad terapéuticamente eficaz se puede definir aquí como una cantidad que restaura el nivel plasmático de antitrombina y/o de proteína C activada y/o de inhibidor de la ruta del factor tisular. Tales niveles plasmáticos se pueden medir fácil y directamente por la persona experta en la técnica usando métodos tal como se describen en *Laboratory Haematology* (1989), ed. Chanarin, Churchill Livingstone, y en *Laboratory techniques in Thrombosis*, a manual (2ª edición revisada de procedimientos de ensayo de ECAT, Eds Jespersen et al., Kluwer Academic Publishers (1999). Se apreciará que, a la vista del tiempo de semivida prolongado de la mayoría de los anticuerpos humanos IgG, los inhibidores parciales de la presente invención, que son anticuerpos monoclonales de la mencionada clase, proporcionarán, en la mayoría de los casos, una prevención y/o tratamiento eficientes con una única administración.

Los inhibidores parciales del factor VIII con glucosilación modificada que se usan en la presente invención muestran

las siguientes ventajas:

- 5 - inhiben la función de FVIII en un grado suficiente para reducir, o inhibir parcialmente, la formación de trombina. La reducción, pero no la supresión completa, de la formación de trombina previene el desarrollo de coagulación intravascular diseminada (DIC), a la vez que permite la formación de coágulos normal. La prevención de DIC mantiene la perfusión orgánica normal y evita la disfunción e insuficiencia orgánica.
- 10 - El mantenimiento de la formación de trombina bajo control reduce la activación de la respuesta antiinflamatoria compensadora. De este modo, la proteína activada C se genera mediante escisión directa de trombina, y el efecto del inhibidor de la ruta del factor tisular depende de la presencia del factor X activado, cuya activación depende directamente de la actividad del cofactor factor VIII. También se produce el agotamiento limitado de la antitrombina (AT) circulante, que se combina directamente con la trombina. En otras palabras, tanto las respuestas compensadoras proinflamatorias como antiinflamatorias se mantienen bajo control regulando la velocidad de formación de trombina.

15 Modificando la glucosilación de los anticuerpos de la presente invención, es posible ajustar de forma fina el efecto de meseta, ya sea usando un único anticuerpo cuyo patrón de glucosilación, y por lo tanto su meseta inhibidora se ha alterado, o bien usando una mezcla de anticuerpos en una relación tal a fin de obtener un efecto de meseta deseado que está situado entre el efecto de meseta de los compuestos individuales. Para trastornos inducidos por inflamación, los anticuerpos inhibidores con glucosilación alterada permiten inhibir la actividad del Factor VIII hasta un nivel en el que se obtiene un balance apropiado entre la inhibición de la formación de trombina y la generación de proteína C activada.

20 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de trastornos de la coagulación en animales, más particularmente en seres humanos, que comprende, como ingrediente activo, el anticuerpo y fragmentos y sus versiones modificadas con un patrón de glucosilación modificado y actividad inhibidora pero afinidad no afectada, tal como se describe aquí anteriormente, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Los vehículos farmacéuticos adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas de la invención se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences 16 ed. (1980), y su formulación es bien conocida por los expertos en la técnica. Incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio), y similares. Se pueden incluir ingredientes adicionales, a fin de controlar la duración de la acción del ingrediente activo del anticuerpo monoclonal en la composición.

35 Las composiciones de liberación controlada se pueden obtener seleccionando vehículos poliméricos apropiados, tales como, por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, y similares. La velocidad de liberación del fármaco y la duración de la acción también se pueden controlar incorporando el ingrediente activo del anticuerpo monoclonal en partículas, por ejemplo microcápsulas, de una sustancia polimérica tal como hidrogeles, poliácido láctico, hidroximetilcelulosa, polimetacrilato de metilo, y los otros polímeros descritos anteriormente. Tales métodos incluyen sistemas de suministro de fármacos coloidales, como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas, etc. Dependiendo de la vía de administración, la composición farmacéutica que comprende el ingrediente activo puede requerir revestimientos protectores. La forma farmacéutica adecuada para uso inyectable incluye disoluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para su preparación extemporánea. Por lo tanto, los vehículos típicos incluyen tampones acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y sus mezclas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La descripción detallada anterior, dada a título de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención a realizaciones específicas descritas, se puede entender conjuntamente con las Figuras que se acompañan, incorporadas aquí como referencia, en las que:

Figura 1: Representación esquemática de la estructura biantenaria más habitualmente encontrada en la parte de unión a antígeno de los anticuerpos. NeuAc = ácido N-acetilneurámico (ácido siálico); Gal = galactosa; GlcNac = N-acetilglucosamina; Man = manosa; Fuc = fucosa; Asn = asparagina.

50 Figura 2: Representación esquemática de la eliminación de glucano mediante tratamiento enzimático secuencial.

55 Para eliminar ácido siálico, la IgG nativa se expone a sialidasa. Con la eliminación de ácidos siálicos, se puede eliminar la galactosa mediante tratamiento con beta-galactosidasa. Tras la eliminación de ácido siálico y galactosa, la N-acetilglucosamina se puede escindir por tratamiento con N-acetil-beta-D-glucosaminidasa. Entonces, los restos de manosa se pueden eliminar mediante tratamiento con alfa-manosidasa.

Figura 3: Gráfica de resultados experimentales que muestra la actividad inhibidora de KRIX-1 nativo y

desglucosilado, según una realización de la invención.

KRIX-1 se desglucosiló mediante tratamiento con N-glucosidasa-F. Para evaluar la actividad inhibidora de nativo (NAT; símbolo en negro) y KRIX-1 desglucosilado (DEG; símbolo blanco), se mezcló un volumen de anticuerpo a diversas diluciones con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. Entonces se midió la actividad residual de FVIII en un ensayo cromogénico.

Figura 4: Gráfica de resultados experimentales que muestra que el mezclado de KRIX-1 desglucosilado con KRIX-1 nativo reduce la inhibición de "meseta" máxima de FVIII, según una realización de la invención.

Se incubó plasma normal durante 2 h a 37°C con diversas concentraciones de Krix-1, Krix-1 desglucosilado, y mezclas de Krix-1 nativo y desglucosilado a una relación de 4,5 y 1,5 anticuerpo nativo frente a anticuerpo desglucosilado. Tras un período de incubación de 2 h a 37°C, la actividad residual de FVIII se midió en un ensayo cromogénico de FVIII.

Figura 5: Gráfica de resultados experimentales que muestra la actividad inhibidora de CHO-recKRIX-1 y KRIX-1 sobre la actividad de FVIII en plasma, según una realización de la invención.

Para evaluar la actividad inhibidora del anticuerpo producido por la estirpe celular humana (KRIX-1) y el anticuerpo recombinante producido en CHO (CHO-recKRIX-1), se mezcló un volumen de anticuerpo a diversas diluciones con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. Entonces se midió la actividad residual de FVIII en un ensayo cromogénico.

Figura 6: Gráfica de resultados experimentales que muestra el efecto de KRIX-1 y CHO-recKRIX-1 sobre trombosis de vena cava en ratones, según una realización de la invención.

Se indujo un trombo en la vena cava inferior 16 horas tras la administración subcutánea de 150 microgramos de KRIX-1 y CHO-recKRIX-1 o disolución salina. Los animales se sacrificaron después de 4 horas. Cinco segmentos transversales a intervalos de 0,5 mm a lo largo de la vena cava infrarrenal se puntuaron 1 si había trombo, o cero si estaba ausente, y se sumaron las puntuaciones.

Figura 7: Gráfica de resultados experimentales que muestra que KRIX-1, CHO-rec-KRIX-1 protege frente a trombosis del pene y priapismo en machos apareados AT^{m/m}, según una realización de la invención.

Se inyectó dos veces subcutáneamente a machos con vehículo (PBS), o con 100 microgramos de anticuerpo mAb Krix-1 o rec-mAB Krix-1, tres días antes y en el día del apareamiento. El resultado trombótico se puntuó cero si los ratones estaban libres de trombosis al final del seguimiento de 8 días, 1 si se observó trombosis microscópica sin priapismo, 2 si se produjo trombosis macroscópica sin priapismo, y 3 si los machos desarrollaron trombosis importante con priapismo irreversible. (#) Un ratón, cada uno en el grupo tratado con mAb Krix-1 o rec-mAB Krix-1, estaba libre de trombosis macroscópica al final del experimento, pero no se pudo analizar por microscopía, y por lo tanto se puntuó con número 1.

Figura 8: Gráfica de resultados experimentales que muestra el efecto inhibitor de CHO-recKRIX-1 y anticuerpos mutados con sitio de N-glucosilación en la región variable, según una realización de la invención.

Para evaluar la actividad inhibidora de los anticuerpos, se mezcló un volumen de anticuerpo a diversas diluciones con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. Entonces, se midió la actividad residual de FVIII en un ensayo cromogénico.

Figura 9: Gráfica de resultados experimentales que muestra la actividad inhibidora de CHO-recKRIX-1 y CHO-recKRIX-1Q, según una realización de la invención.

Para evaluar la actividad inhibidora de los anticuerpos, se mezcló un volumen de anticuerpo a diversas diluciones con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. Entonces, se midió la actividad residual de FVIII en un ensayo cromogénico.

Figura 10: Dibujo que representa el protocolo experimental para trombosis extracorpórea en babuinos. Dispositivos trombogénicos arteriales y venosos. Se implantaron derivaciones arteriovenosas en vasos femorales de babuinos machos. Se incorporaron dispositivos trombogénicos previamente llenados con disolución salina como segmentos de extensión en la derivación arteriovenosa permanente. Se indujo un trombo arterial dependiente de plaquetas insertando Dracon en la pared del tubo silástico. Se generó trombosis venosa dependiente de la coagulación en una cámara de expansión. La deposición de plaquetas radiomarcadas autólogas fue seguida con una cámara de centelleo gamma.

Figura 11: Una gráfica de resultados experimentales que muestra la inhibición de la deposición plaquetaria en las cámaras de trombosis arterial y venosa antes y después de la administración de CHO-recKRIX-1Q, según una realización de la invención.

La deposición plaquetaria se registró en función del tiempo en la cámara de trombosis de expansión

(“venosa”) (A) y en la cámara de trombosis de Dacron (“arterial”) (B) incorporada en una derivación arteriovenosa extracorpórea implantada entre vasos femorales. En los estudios de control, los dispositivos se mantuvieron en el sitio durante 60 minutos, o hasta la oclusión del catéter. Los babuinos se trataron entonces con un único bolo intravenoso de anticuerpo. Después se colocaron nuevos dispositivos trombogénicos durante 60 minutos, 1 h, 24 h después de la inyección del bolo. Entonces se retiraron las derivaciones extracorpóreas.

Figura 12: Gráfica de resultados experimentales que muestra que CHO-recKRIX-1Q protege frente a trombosis del pene y priapismo en machos AT^{m/m} apareados, según una realización de la invención.

Se inyectó dos veces subcutáneamente a machos con vehículo (PBS), o con 100 g de anticuerpo CHO-recKRIX-1Q o un anticuerpo monoclonal humano IgG4 de control (IgG4), tres días antes y en el día del apareamiento. El resultado trombótico se puntuó cero si los ratones estaban libres de trombosis al final del seguimiento de 8 días, 1 si se observó trombosis microscópica sin priapismo, 2 si se produjo trombosis macroscópica sin priapismo, y 3 si los machos desarrollaron trombosis importante con priapismo irreversible. (#) Los animales libres de trombosis macroscópica al final del experimento pero que no se pudieron analizar mediante microscopía se puntuaron 1.

Figura 13: Gráfica de resultados experimentales que muestra la actividad inhibidora del fragmento Fab nativo y desglucosilado de LCL-KRIX-1 y CHO-KRIX-1, según una realización de la invención.

KRIX-1 se desglucosiló mediante tratamiento con N-glucosidasa-F, y se produjeron Fab mediante digestión con papaína. Para evaluar la actividad inhibidora de anticuerpos intactos y Fab nativo y desglucosilado, se mezcló un volumen de anticuerpo a diversas diluciones con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. La actividad residual de FVIII se midió entonces en un ensayo cromogénico.

Figura 14: Gráfica de resultados experimentales que muestra la actividad inhibidora de FVIII del fragmento scFv de KRIX-1 (scFv-KRIX-1 VLVH(His)) producido en *Pichia pastoris*, según una realización de la invención.

Para evaluar la actividad inhibidora de scFv-KRIX-1VLVH(His), se mezcló un volumen de tampón con scFvKRIX-1VLVH(His) a diversas concentraciones con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. La actividad residual de FVIII se midió entonces en un ensayo cromogénico.

Figura 15: Gráfica de resultados experimentales que muestra la actividad inhibidora de FVIII de un fragmento scFv de KRIX-1 y KRIX-1Q, según una realización de la invención.

Para evaluar la actividad inhibidora del fragmento scFv de KRIX-1 y KRIX-1Q, se mezcló un volumen de sobrenadante de cultivo de células CHO, transfectadas con un vector de expresión para scFv-KRIX-1 VLVH(His) (símbolos en blanco) o scFv-KRIX-1 VLVHQ(His) (símbolos negros), a diversas diluciones, con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. La actividad residual de FVIII se midió entonces en un ensayo cromogénico.

Figura 16: Gráfica de resultados experimentales que muestra la inhibición de la unión de FVIII a RHD5 mediante Krix-1 y RHD5.

Se mezcló rFVIII biotinilado con diferentes concentraciones de RHD5 (símbolos negros) o Krix-1 (símbolos blancos) antes de la adición a placas revestidas con RHD5. Las placas se incubaron entonces durante 2 horas a 4°C, y la unión de FVIII se detectó mediante adición de avidina peroxidasa y OPD.

Figura 17: Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable de Krix-1 (los restos de Asn y Thr del sitio de consenso de glucosilación se indican con un asterisco).

Figura 18: Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento scFv de Krix-1Q. Se indica el resto de Gln47 mutado.

Figura 19: Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable de RHD5 (los restos de Asn y Thr de los sitios de consenso de glucosilación putativos se indican con un asterisco).

EJEMPLOS

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitantes.

Ejemplo 1. Efecto de la desglucosilación sobre la inhibición de FVIII por Krix-1

Se mezcló KRIX-1 (0,5 mg/ml en PBS) con N-glucosidasa-F (roche diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a concentración final de 2 U/ml. La mezcla se incubó a 37°C durante 72 horas con agitación suave.

La actividad inhibidora de KRIX-1 nativo y desglucosilado se evaluó en un ensayo de Bethesda (Kasper et al. (1975), citado más arriba). Por lo tanto, se mezcló un volumen de anticuerpo a diversas diluciones en TBS (Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) con un volumen de un conjunto de plasma humano normal, y se incubó durante 2 h a 37°C. El conjunto de plasma normal se constituyó mezclando plasma de 10 individuos normales y tamponándolo mediante adición de Hepes (100 mM) hasta una concentración final de 10 mM. Después, se midió la actividad residual de FVIII usando una modificación del ensayo cromogénico de FVIII de DADE (Dade AG, Marburg, Alemania). En este ensayo, FVIII activado por trombina acelera la conversión del factor X en factor IXa en presencia de factor IXa, PL e iones calcio; la actividad del factor Xa se evalúa entonces mediante hidrólisis de un sustrato de p-nitroanilida. Los reactivos, que se reconstituyeron según la instrucción del fabricante, comprendieron factor X bovino (1 mM), factor IXa (0,3 mM) y trombina (0,3 mM); CaCl₂ (30 mM), PL (60 mM), un sustrato del factor Xa cromogénico (CH₃OCO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.AcOH; 3,4 mM), y un inhibidor de trombina (L-amidinofenilalanina piperidina). Al final del período de incubación de 2 h se recuperaron alícuotas de 30 µl de la mezcla plasma/anticuerpo y se presentaron en placas de microtitulación; se añadieron secuencialmente 30 µl de los reactivos factor X y factor IXa/trombina. Después de 90 s, se añadieron 60 µl del sustrato cromogénico, y la incubación se prolongó durante 10 min. a 37°C. La reacción se bloqueó después mediante adición de 30 µl de ácido cítrico (1 M), y la OD se midió a 405 nm. La actividad residual de FVIII se determinó comparando la OD_{405nm} de las muestras de ensayo con la obtenida con disoluciones de FVIII de concentraciones conocidas. La actividad residual de FVIII se expresó como el porcentaje de actividad medido en alícuotas plasmáticas manipuladas y diluidas exactamente como muestras de ensayo a lo largo de todo el experimento.

KRIX-1 nativo inhibió hasta 90% de la actividad de FVIII. Por el contrario, se logró una inhibición máxima (inhibición de meseta) de sólo 50% con KRIX-1 desglucosilado (Figura 3).

Ejemplo 2. El mezclado de KRIX-1 nativo y desglucosilado permite la selección de mezclas de anticuerpos que inhiben FVIII a diferentes niveles

Se prepararon mezclas que contienen diferente relación de desglucosilada con N-glucosidasa-F frente a KRIX-1 nativo. Cada mezcla se diluyó hasta varias concentraciones de anticuerpo que oscilan entre 0,05 y 25 microgramos/ml. Se mezcló un volumen de cada dilución con un volumen de un conjunto de plasma humano normal. Después de un período de incubación de 2 horas a 37°C, la actividad residual de FVIII se evaluó usando un ensayo cromogénico (ensayo cromogénico de Factor VIII, Dade Behring, Marburg, Alemania). KRIX-1 nativo y desglucosilado inhibieron la actividad de FVIII en alrededor de 90% y 50%, respectivamente (Figura 4). Por el contrario, una mezcla de 4,5 anticuerpos nativos por 1 anticuerpo desglucosilado dio como resultado una inhibición máxima de FVIII de alrededor de 80%, mientras que una mezcla que contiene 1,5 de KRIX-1 nativo por 1 anticuerpo nativo inhibió alrededor del 65% de la actividad de FVIII (Figura 4). Mezclas que inhiben la actividad de FVIII hasta cualquier nivel comprendido entre 50 y 90% se pueden obtener de forma similar variando la relación de KRIX-1 nativo y desglucosilado.

Ejemplo 3. Krix-1 recombinante producido en células CHO (CHO-recKRIX-1) tiene una menor actividad inhibidora de FVIII que Krix-1 (producido por una estirpe celular de linfoblastoide humano)

Se aisló ARN de células B humanas KRIX-1 inmortalizadas mediante EBV usando el reactivo TRIzol según las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Se sintetizó ADNc con el sistema de preamplificación SuperScript para síntesis de ADNc de primera cadena.

Las secuencias que codifican la cadena pesada o ligera se amplificaron mediante RT-PCR en ARNm preparado a partir de células KRIX-1 usando el kit de purificación QuickPrep®Micro mRNA (Amersham Pharmacia Biotech, Rosendaal, Países Bajos). Los cebadores de la PCR específicos para la cadena pesada fueron: cebador directo 5'-cggggtaccacc**ATGG**ACTGGACCTGGAGGATC-3' (SEQ ID NO:5) que corresponde a los nucleótidos (nt) 1 a 21 (en mayúsculas) de la secuencia de ADNc (documento WO 01/04269 A1), y que contiene un sitio *KpnI* (subrayado) para fines de clonación y una secuencia de Kozak (cursiva en negrita); cebador inverso: 5'-tatggccgacgtcgactc**ATTTACCCGGAGACAGGGAGAG**-3' (SEQ ID NO: 6) que corresponde a nt 1800-1780 (mayúsculas) del extremo 3' de la región constante gamma-4 humana (número de acceso K01316) y que contiene un codón de parada (en cursiva y negrita) y un sitio *Sall* (subrayado) para fines de clonación. Los cebadores específicos para la cadena ligera fueron: cebador directo 5'-cccaagcttccacc**ATGG**AAACCCAGCKCAGCT-3' (SEQ ID NO: 7) que corresponde a nt 1-20 (mayúsculas) de la secuencia de ADNc (documento WO 01/04269 A1), y que contiene un sitio *HindIII* (subrayado) para fines de clonación y una secuencia de Kozak (en cursiva y negrita); cebador inverso: 5'-aaacagcctctagacta**ACACTCTCCCTGTTGAAG**-3' (SEQ ID NO: 8) que corresponde a nt 653-635 del extremo 3' de la región constante kappa humana (número de acceso V00557) y que contiene un codón de parada (en cursiva y negrita) y un sitio *XbaI* (subrayado) para fines de clonación. Tras la verificación de las secuencias, las secuencias de las cadenas pesada y ligera se clonaron consecutivamente en el plásmido pBudCE4 (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) diseñado para la expresión génica doble en células eucariotas bajo el control del promotor EF1-alfa y el CMV, respectivamente, usando los sitios de restricción indicados anteriormente. El vector final se usó para la transfección estable de células CKO-K1 usando el sistema FuGENE6 (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se cultivaron en DMEM (Life Technologies, Paisley, UK) suplementado con 10% de FCS, 4 mmoles/l de glutamina y 80 mg/l de gentamicina (Geomycin®, Schering-Plough, Heist-op-den-Berg, Bélgica) en presencia de zeocina (concentración de selección 0,7

mg/ml, o concentración de mantenimiento 0,35 mg/ml; Life Technologies, Invitrogen), y se verificaron en busca de la producción de anticuerpos mediante ELISA (véase más abajo). Las células se adaptaron para crecer en medio libre de suero mediante reducción por etapas del FCS hasta 0%, y tras la dilución clonal, el mejor productor en términos de funcionalidad (ELISA en huFVIII), así como expresión (ELISA con anticuerpo de detección anti-IgG4 humana), se usó para la producción por lotes.

Para la detección de anticuerpos anti-FVIII, se insolubilizó rFVIII incubando placas durante 2 h a 4°C directamente con 50 µl de rFVIII (1 microgramo/ml) diluido en disolución salina tamponada con glicina (GBS). Las placas se lavaron como antes, y se añadieron 50 µl de sobrenadante de cultivo para una incubación posterior de 2 h a 4°C. Tras el lavado, se añadieron 50 µl de IgG de cabra anti-Fc gamma humano (Sigma), diluido 1000 veces en Tris-caseína. Después de 2 h a RT, las placas se lavaron nuevamente y se suplementaron con 100 µl de OPD. La OD resultante se leyó a 492 nm en un lector de microplacas Emax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Los controles negativo y positivo fueron medio de cultivo e IgG purificada a partir de un paciente con hemofilia A con inhibidor de título elevado, respectivamente.

El anticuerpo recombinante se purificó a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante adsorción sobre proteína A inmovilizada (High-TRAP Protein A, Pharmacia, Uppsala, Suecia). El sobrenadante del cultivo se hizo pasar a través de una proteína A high-TRAP^R (Pharmacia, Uppsala, Suecia) a un caudal de 1 ml/min. La IgG unida se eluyó con ácido cítrico 100 mM, pH 3. Después de la neutralización del pH con Tris pH 9, IgG se dializó contra disolución salina tamponada con fosfato (PBS). La concentración de proteínas se determinó con el ensayo de Bio-Rad (Biorad).

El anticuerpo recombinante producido en células CHO se denominó CHO-recKRIX-1. De forma interesante, la inhibición máxima observada en gran exceso de este anticuerpo sólo alcanza 75-85% de la actividad de FVIII, que es menor que la inhibición máxima (meseta) de 85-95% observada cuando se incubaba FVIII con KRIX-1 (producido por la estirpe celular de linfoblastoide humano (Figura 5).

Ejemplo 4. Prevención de trombosis de vena cava usando CHO-recKRIX-1 en ratones

Se produjo un trombo en la vena cava inferior de ratones de tipo salvaje machos adultos (peso 18 g – 31 g, edad 8-10 semanas) usando un modelo descrito previamente (Singh et al. 2002 citado más arriba). Los ratones se anestesiaron con isoflurano, la vena cava inferior se expuso por debajo de las venas renales vía una laparotomía mediana, y se aplicó una grapa vascular neuroquirúrgica (Braun Medical) durante 15 segundos en dos ocasiones, espaciadas 30 segundos, a un segmento de la vena cava. Entonces se colocó un hilo de prolene 5/0 junto a la vena cava, y se produjo una estenosis atando una sutura de seda 4/0 alrededor de la vena cava y del hilo de prolene. El hilo se retiró para permitir que se reanudara el flujo de sangre. El abdomen se cerró, y se dejó que el animal se recuperara. Después de 4 horas, los ratones se volvieron a anestésiar, y una porción de 1 cm de la vena cava inferior (entre el punto de ligadura y la bifurcación ilíaca) se extirpó y se examinó en busca de la presencia de trombo. Los segmentos extirpados se lavaron entonces en 10% de PBS y se empaparon toda la noche en 1% de paraformaldehído. Los segmentos de los vasos se embebieron en cera de parafina, y se cortaron secciones transversales de 7 x 10 µm a intervalos de 0,5 mm desde la ligadura hacia abajo.

Las secciones se tiñeron mediante hematoxilina y eosina, azul escarlata de Martius (MSB) y un anticuerpo antiplaquetas de conejo (Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY 11590). MSB tiñe de rojo a la fibrina reciente, o de azul/gris a la fibrina madura, de amarillo a los glóbulos rojos, y de azul brillante al colágeno. El tamaño del trombo se midió puntuando las 7 secciones en busca de la presencia de trombo, dando una puntuación de 1 para la presencia y 0 para la ausencia de trombo en cada una. Las puntuaciones se sumaron entonces para cada animal. Los investigadores que llevaban a cabo las operaciones y los análisis microscópicos desconocían los grupos de tratamiento.

La trombosis se indujo en tres grupos de ratones de tipo salvaje 16 horas tras la inyección subcutánea de 150 microgramos de anticuerpo o de disolución salina. La significancia estadística de las diferencias entre grupos se evaluó en presencia o ausencia de trombo usando la prueba exacta de Fisher (de 2 colas). Los efectos sobre el tamaño del trombo se ensayaron comparando las puntuaciones del trombo usando la prueba de la U de Mann-Whitney.

Diez de 14 ratones inyectados con disolución salina desarrollaron un trombo, visible macroscópicamente, en comparación con 0 de los 7 animales en cada uno de los grupos tratados previamente con KRIX-1 o CHO-recKRIX-1 ($P < 0,01$).

El análisis histológico identificó trombos en 11 de 14 animales de control y 1, 1, y 2 trombos, respectivamente, en animales tratados con KRIX-1 o CHO-recKRIX-1 (Figura 6). En consecuencia, aunque CHO-recKRIX-1 inhibe la actividad de FVIII significativamente menos que KRIX-1, CHO-recKRIX-1 inhibe la trombosis de forma muy eficiente, y por lo tanto ofrece un mejor perfil de seguridad/eficacia que el anticuerpo KRIX-1 nativo.

Ejemplo 5. Actividad antitrombótica de CHO-recKRIX-1 en ratones con deficiencia de antitrombina (AT^{m/m}) en el sitio de unión a heparina tipo II (HBS)

La eficacia antitrombótica de CHO-recKRIX-1 se evaluó usando el modelo de priapismo trombótico en ratones con deficiencia de antitrombina en el sitio de unión a heparina tipo II (HBS) (Dewerchin et al., presentado).

5 Los ratones se generaron previamente insertando de forma específica una mutación R48C (que corresponde a la mutación R47C de "Toyama" en el hombre, que suprime la unión de heparina/sulfato de heparano y la actividad del cofactor (Koide et al. (1983) *Thromb Res.* 31, 319-328; Koide et al. (1984) *Natl. Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 289-293) en el HBS de antitrombina (AT) (ratones AT^{m/m}), dando como resultado una amenaza para la vida, trombosis espontánea en sitios diferentes, más prominentemente en el corazón, hígado, y en vasos oculares, placentarios y del pene (Dewerchin et al, enviado para publicación). La observación de aparición de priapismo con el apareamiento de machos AT^{m/m} proporcionó la base del desarrollo de un modelo fisiológico de trombosis venosa, proporcionando un punto final definido y una fácil puntuación del resultado trombótico.

15 Se inyectó subcutáneamente dos veces (tres días antes del apareamiento, y en el día del apareamiento) a grupos de edad parecida de machos sexualmente maduros (2 a 4 meses) con 100 µl de disolución salina o con 100 µl de una disolución 1 mg/ml de Krix-1, CHO-recKRIX-1Q o CHO-recKRIX-1. Después de la segunda inyección, cada macho se apareó con dos hembras Suizas de tipo salvaje, que se sustituyeron por dos nuevas hembras en el día 3 después del apareamiento. La formación de un tapón de moco vaginal, que indica apareamiento reciente, se registró diariamente para todas las hembras, y sólo se incorporaron en el análisis los resultados obtenidos con machos con actividad sexual confirmada. Los machos se examinaron diariamente en busca del desarrollo de priapismo, y se sacrificaron cuando se observó priapismo, o en el día 8 después del apareamiento inicial cuando el experimento se terminó. En el sacrificio, se recogieron muestras de sangre para la determinación de la actividad residual de FVIII y los niveles de IgG humana como se describe anteriormente. Los penes se disecaron, y se determinó mediante inspección visual la presencia de trombo en la vena peneal dorsal y córpora cavernosa. Tras el sacrificio, los penes disecados se fijaron en paraformaldehído, se embebieron en parafina y se procesaron para el análisis histológico. Se tiñeron secciones transversales de siete µm con hematoxilina/eosina para el análisis microscópico. Puntuación: El resultado trombótico se puntuó usando cuatro categorías: 0, nada de trombosis; 1, trombosis de la vena peneal mediante microscopía; 2, trombosis macroscópicamente visible de la vena peneal; 3, priapismo trombótico irreversible. Cuando no se observó trombo macroscópicamente visible y no se pudo obtener por razones técnicas ninguna histología de la vena peneal, los animales también se puntuaron 1. Los investigadores que llevaron a cabo las inyecciones y la monitorización de los ratones no conocían los grupos de tratamiento. La significancia estadística de las diferencias entre puntuaciones de trombo se ensayaron usando la prueba de la U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis.

La presencia de un tapón de moco vaginal en al menos 2 hembras con un período de seguimiento para cada uno de estos machos tratados con anticuerpo o con disolución salina confirmó la actividad sexual real de los machos.

35 KRIX-1, CHO-rec-KRIX-1 fueron capaces de evitar priapismo en todos los ratones ensayados ($p < 0,05$ frente a disolución salina) (Figura 7). En el grupo inyectado con 2 x 100 g de anticuerpo KRIX-1, ninguno de los cinco machos desarrolló priapismo; cuatro de ellos también estuvieron libres de trombosis al inspeccionarlos visualmente y mediante análisis microscópico al final del experimento; los machos restantes no mostraron trombosis macroscópica. Por razones técnicas, no se pudo llevar a cabo ningún análisis histológico, y por lo tanto el animal se puntuó 1 (Figura 7), la puntuación máxima que se pudo atribuir si se hubiese llevado a cabo el análisis.

40 Se observó un resultado similar para el anticuerpo CHO-rec-KRIX-1 recombinante: ninguno de los siete machos tratados desarrolló priapismo; cinco machos también estuvieron libres de trombosis macroscópica o microscópica (Figura 7); un macho mostró trombosis sólo microscópicamente detectable (puntuación 1) (Figura 7), y el otro macho estaba libre de trombosis macroscópicamente visible pero no se pudo analizar por microscopía y por lo tanto también se puntuó 1 (Figura 3).

Ejemplo 6. Actividad antitrombótica de CHO-recKRIX-1Q en ratones con deficiencia de antitrombina (AT^{m/m}) en el sitio de unión a heparina tipo II (HBS)

50 Como se esquematiza en el ejemplo 5, la eficacia antitrombótica de CHO-recKRIX-1Q se evaluó usando el modelo de priapismo trombótico en ratones con deficiencia de antitrombina en el sitio de unión a heparina de tipo II (HBS) (Dewerchin et al. (2003) *Circ Res* 93,1120-1126).

En el ejemplo presente, a grupos de edad parecida de machos sexualmente maduros se les inyectó subcutáneamente dos veces (tres días antes del apareamiento, y en el día del apareamiento) con 100 µl de disolución salina o con 100 µl de una disolución 1 mg/ml de CHO-recKRIX-1Q, un anticuerpo monoclonal IgG4 humano de control, que no reconoce FVIII, o el vehículo (PBS).

55 CHO-recKRIX-1 fue capaz de reducir el desarrollo de la trombosis ($p < 0,05$ frente a PBS e IgG4 de control) (Figura 12). En el grupo inyectado con 2 x 100 microgramos de anticuerpo CHO-recKRIX-1Q, ninguno de los machos murió o desarrolló priapismo. Todos los animales tratados con CHO-recKRIX-1Q también estuvieron libres de trombosis al

inspeccionarlos visualmente. Por razones técnicas, no se pudo realizar ningún análisis histológico, y el animal se puntuó por lo tanto 1 (Figura 12), la puntuación máxima que se podría haber atribuido si se hubiera realizado el análisis. Por el contrario, en los grupos tratados con PBS o con un anticuerpo monoclonal IgG4 humano de control, varios animales murieron o desarrollaron priapismo ($p < 0,01$, CHO-recKRIX-1Q frente a PBS e IgG4 de control).

5 Ejemplo 7. Producción y caracterización de variante de CHO-recKRIX-1 desprovista de sitio de N-glicosilación en el sitio de unión a antígeno

10 CHO-recKrix-1Q se produjo mediante mutagénesis dirigida al sitio en el plásmido pCR4-Blunt-TOPO-Krix-1 H que da como resultado un cambio de un solo aminoácido en la cadena pesada que altera el Asn47 a Gln47, a fin de destruir el sitio de glucosilación enlazado mediante N en Asn47-Thr49. En el contexto de la presente invención, se pueden usar de forma similar otros plásmidos que comprenden la secuencia codificante del anticuerpo krix-1. Las secuencias de aminoácidos que comprenden las CDRs de las cadenas pesada y ligera de Krix-1 se proporcionan en SEC ID NO:2 y SEC ID NO: 4, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de las CDRs de las cadenas pesada y ligera de Krix-1 se proporcionan en SEC ID NO:1 y SEC ID NO: 3, respectivamente.

15 La mutagénesis en Asn47 se obtuvo usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene, La Jolla, CA) en combinación con los siguientes cebadores de la PCR específicos:

Cebador directo:

5'-CCTGCAAGACCTCTGGATAC***cAa***ATTCACCGGCTACTCTGCTTCTGG-3' (SEC ID NO: 9), que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (*a a c y c a a*; en cursiva y en negrita);

20 Cebador inverso:

5'-CCAGAAGCAGAGTAGCCGGTGA***AfTg***GTATCCAGAGGTCTTGCAGG-3' (SEC ID NO: 10), que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (*g a t y t a g*; en cursiva y en negrita);

25 CHO-recKrix-1A se produjo mediante mutagénesis dirigida al sitio, dando como resultado un cambio de un solo aminoácido que altera Thr49 a Ala49, a fin de destruir el sitio de glucosilación enlazado mediante N en Asn47-Thr49.

Esto se obtuvo usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene, La Jolla, CA) en combinación con los siguientes cebadores de la PCR específicos:

30 Cebador directo: 5'-CCTCTGGATACA***ACTTCgCt***GGCTACTCTGCTTCTGG-3' (SEC ID NO: 11), que corresponde a nt 128 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (*a a g y c a t*; cursiva y negrita);

Cebador inverso: 5'-CCAGAAGCAGAGTAGCC***aGc***GAAGTTGTATCCAGAGG-3' (SEC ID NO: 12), que corresponde a nt 128 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (*g a a y t a c*; cursiva y negrita);

35 CHO-recKrix-1E se produjo mediante mutagénesis dirigida al sitio, dando como resultado un cambio de un solo aminoácido que altera Asn47 a Glu47 a fin de destruir el sitio de glucosilación enlazado mediante N en Asn47-Thr49

40 Cebador directo: 5'-CCTGCAAGACCTCTGGATAC***gAg***TTCACCGGCTACTCTGCTTCTGG-3' (SEC ID NO: 13), que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (*a a g y c a g*; cursiva y negrita);

Cebador inverso: 5'-CCAGAAGCAGAGTAGCCGGTGA***AcTc***GTATCCAGAGGTCTTGCAGG-3' (SEC ID NO: 14), que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (*g a c y t a c*; cursiva y negrita).

45 CHO-recKrix-1D se produjo mediante mutagénesis dirigida al sitio, dando como resultado un cambio de un solo aminoácido que altera Asn47 a Asp47, a fin de destruir el sitio de glucosilación enlazado mediante N en Asn47-Thr49.

Cebador directo: 5'-CCTGCAAGACCTCTGGATAC***gACTT***CACCGGCTACTCTGCTTCTGG-3' (SEC ID NO: 15), que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene un nucleótido alterado (*a a g*; cursiva y negrita);

50 Cebador inverso: 5'-CCAGAAGCAGAGTAGCCGGTGA***AGTc***GTATCCAGAGGTCTTGCAGG-3' (SEC ID NO: 16), que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de Krix-1 (mayúsculas) que contiene un nucleótido alterado (*t a c*; cursiva y negrita).

Tras la verificación de las secuencias, la cadena pesada mutada y la cadena ligera de Krix-1 de tipo salvaje (nativo) se clonaron en el vector pEE6.4 y pEE14.4 (Lonza Biologics, Portsmouth, NH), respectivamente. Los dos vectores se combinaron en un vector génico doble – que contiene tanto la cadena pesada como la cadena ligera – usando los sitios de restricción *NotI* y *SaII* presentes en ambos vectores. La expresión de las cadenas pesada y ligera en células eucariotas está bajo el control del promotor HCMV-MIE (presente en pEE14.4 y pEE6.4). El vector génico doble se linealizó con *SaII* antes de la transfección.

El vector linealizado se usó para la transfección estable de células CKO-K1 usando el reactivo de transfección FuGENE6 (Roche, Bruselas, Bélgica) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se cultivaron en DMEM libre de glutamina (JRH Biosciences, Lenexa, KS) suplementado con FBS al 10%, suplemento GS (JRH Biosciences, Lenexa, KS) y 25 μ M de L-metionina sulfoximina (MSX) (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) para la selección.

Los mejores productores se adaptaron para crecer en medio libre de suero (medio libre de suero (EX-CELL 302 sin L-glutamina, JRH Biosciences, Lenexa, KS) - suplementado con 25 μ M de MSX y suplemento GS – mediante reducción por etapas del FBS hasta 0%. La estirpe celular funcional de mejor expresión (ELISA con anticuerpo de detección anti-IgG4 humana) se usó para la producción discontinua del rec-mAb-Krix-1 mutado, ya sea usando la estirpe celular adherente o la estirpe celular de suspensión.

El anticuerpo recombinante se purificó a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando una columna HiTrap rProtein A FF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Después de concentrar, los rec-mAb-KRIX-1Q (A, E y D, resp.) se ensayaron para determinar la funcionalidad (ensayo cromogénico para evaluar la capacidad del rec-mAb Krix-1 mutado para inhibir la actividad de FVIII). La capacidad inhibidora frente a FVIII se comparó con la del rec-mAb Krix-1 de tipo salvaje (figura 8 y 9). La inhibición de FVIII mediante estos mutantes osciló de 30 a 40%.

Medida de resonancia de plasmones superficiales (SPR).

La velocidad de asociación y disociación de FVIII a CHO-rec-KRIX-1Q, CHO-rec-KRIX-1A y CHO-rec-KRIX-1 nativo se analizó mediante un instrumento Pharmacia Biosensor BIAcore™ (Pharmacia Biosensor AB). Se inmovilizó anticuerpo modificado (20 microgramos/ml en 10 mM de tampón de acetato de sodio pH 5,0) sobre la superficie activada de un chip sensor CM5, según las instrucciones del fabricante. Todos los experimentos de unión se llevaron a cabo en HBS a un caudal constante de 10 μ l/min. Se infundió FVIII en disolución salina tamponada con Hepes (HBS) a diversas concentraciones sobre el anticuerpo revestido sobre la superficie del chip sensor. Al final de cada ciclo, la superficie se regeneró inundando con HCl, pH 2, durante 36 segundos. Los experimentos de control aseguraron que FVIII se une sólo a anticuerpo insolubilizado. De este modo, rFVIII no se unió al chip sensor en ausencia de anticuerpo, y la preincubación de rFVIII con anticuerpo soluble antes de la adición al chip evitó completamente la unión de FVIII.

Las constantes de velocidad de asociación y de disociación se determinaron mediante ajuste no lineal de datos de sensograma individuales (O'Shanessy et al. 1993, *Analyt Biochem* 212: 457) usando el software BIA evaluation 2.1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Los valores de k_{ass} y k_{diss} se determinaron promediando los valores obtenidos para curvas individuales obtenidas con diversas concentraciones de analito. Los valores de k_{diss} se determinaron a partir de las curvas individuales obtenidas con solamente la concentración más elevada de analito, a fin de reducir el sesgo debido a la unión nuevamente del analito al ligando inmovilizado libre. Todos los datos se analizaron tras la corrección del valor base inicial restando la respuesta observada antes de la inyección del analito (rFVIII) de los valores de respuesta obtenidos durante las fases de asociación y disociación.

La constante de disociación (K_D) de FVIII a partir de CHO-rec-KRIX-1Q, CHO-rec-KRIX-1A y CHO-rec-KRIX-1 nativo fue muy similar (Tabla 1). En consecuencia, el sitio de glucosilación en el sitio de unión a antígeno de mAb Krix-1 influye en la actividad inhibidora del anticuerpo, pero no contribuye significativamente a la unión a FVIII.

Tabla 1. Análisis de resonancia de plasmones superficiales de la unión de FVIII a mAb Krix-1 y sus derivados.

mAb Krix-1 modificado (LCL):	KD (nM)
CHO-recKRIX-1	0,14 \pm 0,03
CHO-recKRIX-1Q	0,17 \pm 0,02
CHO-recKRIX-1A	0,13 \pm 0,01

Ejemplo 8. Prevención de trombosis arterial y venosa en babuinos.

Métodos

Protocolo

5 Se usaron babuinos machos (*Papio ursinus*). Los animales pesaron entre 8 y 17 kg, y estuvieron libres de enfermedades durante al menos 6 meses antes de los experimentos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético para Experimentación con Animales de la University of the Free State según el Código Nacional para Uso de Animales en Investigación, Educación, Diagnóstico y Ensayo de Fármacos y Sustancias Relacionadas en África del Sur.

10 Se implantaron derivaciones arteriovenosas (AV) permanentes de politetrafluoroetileno (Teflon) y caucho de silicona (Silastic) en los vasos femorales de los babuinos. El caudal sanguíneo a través de las derivaciones varió entre 100 y 120 ml/min. El manejo de los babuinos se logró mediante anestesia con hidrocloreto de quetamina (Anaket-V, Centaur Laboratory).

15 En cada experimento, se incorporó un dispositivo trombogénico, llenado previamente con disolución salina para evitar la interfaz sangre-aire, como un segmento de extensión en la derivación arteriovenosa permanente por medio de conectores de Teflon (Kotze et al. (1983) *Thromb Haemost.* 70, 672-675). Se indujo un trombo arterial dependiente de plaquetas mediante el uso de Dacron insertado en la pared de tubería Silastic (diámetro interior 3 mm) según Hanson et al. (1985) *Arteriosclerosis* 5, 595-603 (Figura 10).

20 El material de injerto vascular de Dacron (1,26 cm²) sirvió como un generador de trombosis de tipo arterial dependiente de plaquetas. Para generar una trombosis venosa dependiente de la coagulación, se usó una cámara de expansión (3,77 cm²). La sangre fluyó a través de los dispositivos trombogénicos a un caudal de aproximadamente 120 ml/min. El esfuerzo de cizallamiento inicial fue 318 s⁻¹ para la sección de Dacron, y 10 s⁻¹ para la cámara de expansión.

25 En los estudios de control, los dispositivos se mantuvieron en el lugar durante 60 minutos o hasta que se ocluyeron, después de lo cual se retiraron y se reestableció el flujo sanguíneo a través de la derivación AV permanente. Los babuinos se trataron entonces con un único bolo intravenoso de 1,25 ó 5 mg/kg de CHO-rec-Krix-1Q. Los dispositivos trombogénicos se colocaron durante 60 minutos 1 h tras la inyección del anticuerpo, después de lo cual los dispositivos se retiraron y se reestableció el flujo sanguíneo a través de la derivación AV permanente. Se llevaron a cabo estudios de 60 minutos adicionales a 24 h y 48 h después de la inyección de bolo de anticuerpo. Las derivaciones extracorpóreas se retiraron entonces después del último experimento de trombosis. Se tomaron muestras de sangre según el calendario de muestreo, bien directamente a partir de la derivación o bien mediante venopunción. En todas las muestras, se midió la actividad de FVIII, se monitorizó las concentraciones de mAb Krix-1, PT, APTT, fibrinógeno.

30 Formación de imágenes de injerto.

35 Plaquetas autólogas se marcaron con ¹¹¹In-tropolona, y se volvieron a inyectar en el animal 1 h antes del comienzo del experimento de control. Esto permitió la adquisición de imágenes en el día 0, 1 y 2. Para proporcionar una adquisición de imágenes en el día 6 ó 14, se repitió el procedimiento de marcaje. La adquisición de imágenes de los injertos se realizó con una cámara de centello gamma ajustada con un colimador de alta resolución. Las imágenes se almacenaron en y se analizaron con un sistema computador formador de imágenes y de análisis conectado con la cámara de centelleo. Adquisición de imágenes dinámicas, también se adquirieron imágenes durante 3 minutos de una muestra de sangre autóloga de 5 ml cada vez que se realizaron imágenes de los injertos para determinar la radioactividad de la sangre (patrón sanguíneo). Las regiones de interés de los segmentos del injerto y de expansión se seleccionaron para determinar la radioactividad depositada y en circulación en la imagen dinámica. Se calculó el número total de plaquetas depositadas sobre el material de injerto vascular y en la cámara de expansión.

45 En 6 animales tratados con CHO-rec-KRIX-1E, la deposición plaquetaria fue menor que en el animal de control tratado con disolución salina, tanto en las cámaras de trombosis venosa como arterial (Figura 11).

Ejemplo 9. Tratamiento de afecciones relacionadas con septicemia con anticuerpos inhibidores frente al factor VIII con glucosilación modificada.

50 La inyección de endotoxina provoca la producción de citocinas proinflamatorias, entre las cuales IL-6 y TNF- α son importantes por sus interacciones con el sistema de coagulación. De este modo, IL-6 aumenta la producción de factor tisular y, en consecuencia, la generación de trombina. También incrementa la producción de fibrinógeno mediante un mecanismo independiente. TNF- α incrementa los niveles de inhibidor de la activación de plasminógeno tipo I (PAI-1), y de ese modo reduce la fibrinólisis.

Para cada tratamiento, se constituyeron grupos de seis ratones (C57Bl/6). Se inyectaron intravenosamente a ratones de tipo salvaje y sin FVIII con 30 y 100 microgramos de los siguientes anticuerpos:

- nada de anticuerpo
 - anticuerpo de control (IgG4)
 - anticuerpo Krix1 expresado en células CHO (CHO-recKRIX-1)
 - Krix 1 mutado en Asn47 (CHO-recKRIX-1Q)
- 5 - (KRIX-1)/(CHO-recKRIX-1Q) en una relación ¼ u otra relación.

Se prevén otras mezclas que comprenden Krix-1 para el ensayo, tal como mezclas que comprenden fragmentos de Krix-1 nativo o desglucosilado (más particularmente, fragmentos Fab o scFv). También se consideran otras mezclas que comprenden Krix-1 y un segundo anticuerpo (como se describe en el ejemplo 13) o sus derivados. Una mezcla particular comprende Krix-1 y RHD5, o fragmentos de Krix-1 y/o RHD5.

10 60 minutos tras la administración del anticuerpo, se inyectó intraperitonealmente a la diferente población de ratones con 4 microgramos o 40 microgramos o 400 microgramos de lipopolisacárido (procedente del serotipo 0:111:B4 de *E. coli*) por 20 g de peso corporal. 90 minutos más tarde, para cada configuración experimental, se toma sangre de parte de la población mediante punción cardíaca en tampón de citrato, para la evaluación de los niveles de citocinas y de factores de coagulación. El plasma se obtiene mediante centrifugación durante 5 minutos a 5.000 rpm.

15 La supervivencia de los ratones que quedan se sigue durante una semana.

El grado en el que la ruta fibrinolítica se ve afectada por una inyección de lipopolisacárido de 40 microgramos por 20 g de peso corporal se evalúa midiendo concentraciones de los dos inactivadores principales de la ruta, a saber, PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno-I) y α_2 -antiplasmina, usando un ELISA de tipo sándwich con dos anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra sitios diferentes de la molécula bajo evaluación.

20 La evolución de las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno se usa como una lectura de su conversión en fibrina.

La determinación de cinógeno y de proteína C activada se puede medir, por ejemplo, según Richards et al. (1990) Clin. Chem. 36, 1892-1896.

25 El presente experimento permite la identificación de un anticuerpo adecuado o mezcla de anticuerpos a fin de prevenir la septicemia relacionada con endotoxinas. Se pueden idear experimentos análogos para otros componentes, o afecciones que conducen al aumento de las citocinas inflamatorias IL-6 y/o TNF-alfa.

Ejemplo 10. Producción de fragmento de unión a antígeno (Fab) de Krix-1 nativo y desglucosilado.

LCL- y CHO-KRIX-1 (0,5 mg/ml en PBS) se mezcló con N-glucosidasa-F (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a concentración final de 2 U/ml. La mezcla se incubó a 37°C durante 72 horas con agitación suave.

30 Los fragmentos Fab se produjeron incubando LCL- y CHO-KRIX-1 (0,5 mg/ml) en tampón de fosfato (KH₂PO₄ 0,039M, Na₂HPO₄ 0,068M, pH 7,0 con cisteína (0,05 M), EDTA (1 mM) y papaína (10 microgramos/ml). Después de 3 h de incubación a 37°C, la reacción se detuvo añadiendo 0,075M de yodoacetamina. Después de 30 min. a 20°C, la mezcla se dializó frente a disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Los anticuerpos sin digerir se eliminaron mediante adsorción sobre HiTrap Protein A (Farmacia).

35 La actividad inhibidora de Fab de KRIX-1 nativo y desglucosilado se evaluó en un ensayo de Bethesda (Kasper et al. (1975), citado más arriba), y se muestra en la Figura 13.

Ejemplo 11. Producción y caracterización de fragmento scFv de KRIX-1 y KRIX-1Q

Clonación de scFv-KRIX-1 VLVH en vector de expresión de *Pichia*

40 Se construyó un fragmento scFv de KRIX-1 añadiendo una secuencia ligadora entre el extremo 3' de la parte variable de la cadena ligera de KRIX-1 (VL) y el extremo 5' de la parte variable de la cadena pesada (VH). Esto se obtuvo mediante amplificación por PCR de la cadena ligera de KRIX-1 y las cadenas pesadas usando los siguientes cebadores:

45 Para la cadena ligera: cebador directo 5'-gtatctctcgaaaagaGAAAT-TGTGTTGACGCAGTCTCCAGGC-3' [SEC ID NO:17], que corresponde al extremo 5' de la secuencia de KRIX-1 VL (mayúsculas) y que contiene un sitio de restricción *Xho*I (subrayado) y una secuencia KEX1 (cursiva y negrita); cebador inverso 5'-cgccagagccacctccgcctgaaccgcctccaccTCGTTTGATCTCCACCTTGTC [SEC ID NO:18], que corresponde al extremo 3' de la secuencia de KRIX-1 Jk (mayúsculas), y que contiene una parte de la secuencia ligadora (cursiva).

Para la cadena pesada: cebador directo 5'-caggcggaggtggctctggcgggtggcggatcgCAGGTMACAGCTGGTGACAGTCTGGG-3' (SEC ID NO:19), que corresponde al

extremo 5' de la secuencia de KRIX-1 VH (mayúsculas), y que contiene una parte de la secuencia ligadora (cursiva); cebador inverso 5'-gatctctcagaTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC [SEC ID NO:20], que corresponde al extremo 3' de la secuencia de KRIX-1 JH (mayúsculas), y que contiene un sitio de restricción *Xba*I (subrayado).

5 Los productos de la PCR se hibridaron, y se llevó a cabo una segunda PCR usando el cebador directo para la cadena ligera (SEC ID NO:17) y el cebador inverso para la cadena pesada (SEC ID NO: 20). El scFv-KRIX-1VLVH resultante se clonó en el vector de expresión pPICZalphaC (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica).

Clonación de scFv-KRIX-1VLVH con etiqueta His(6) en vector de expresión de Pichia

10 Se añadió un sitio de restricción *Sa*II a la secuencia de scFv-KRIX-1VLVH a fin de clonarla en el marco con la secuencia de His(6) incluida en el vector de expresión pPICZalphaC (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica). Esto se obtuvo mediante PCR usando el cebador directo 5'-gtatctctcagagaaaga-GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGC-3' (SEC ID NO:21) que corresponde al extremo 5' de la secuencia de KRIX-1 VL (mayúsculas), y que contiene un sitio de restricción *Xho*I (subrayado) y una secuencia KEX1 (cursiva y negrita); y el cebador inverso 5'-catggtcagcTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCCGGCC-3' (SEC ID NO:22) que corresponde al extremo 3' de la secuencia JH de la cadena pesada de KRIX-1 (mayúsculas), y que contiene un sitio de restricción *Sa*II (subrayado).

15 El vector pPICZalphaC-scFv-KRIX-1VLVH(His) final se usó para transformar células X33 para la producción de scFv. El sobrenadante se ensayó para demostrar la presencia de un fragmento scFv funcional.

20 El fragmento scFv se purificó usando el HisTrap Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Después de concentrar, el scFvKRIX-1 VLVH(His) se ensayó en un ensayo cromogénico de FVIII para evaluar la capacidad del scFvKRIX-1VLVH(His) para inhibir la actividad de FVIII. La capacidad inhibidora de FVIII se evaluó en un ensayo de Bethesda según el método del ejemplo 1 y como se muestra en la Figura 14.

Clonación de scFv-KRIX-1 VLVHQ con la etiqueta His(6) en vector de expresión de Pichia

scFv-KRIX-1 VLVHQ(His) se produjo mediante mutagénesis dirigida al sitio en el pPICZalphaC-scFv-KRIX-1VLVH(His), dando como resultado un cambio de un único aminoácido en la cadena pesada, que sustituye Asn47 por una glutamina, a fin de destruir el sitio de glucosilación enlazado mediante N en Asn47-Thr49.

25 Esto se obtuvo usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene, La Jolla, CA) en combinación con los siguientes cebadores de la PCR específicos:

Cebador directo: 5'-CCTGCAAGACCTCTGGATACcAaTTCACCGGCTACTCTGCTTCTGG-3' (SEC ID NO: 23) que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de KRIX-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (a a c y c a a; cursiva y negrita).

30 Cebador inverso: 5'-CCAGAAGCAGAGTAGCCGGTGAaTtGTATC-CAGAGGTCTTGCAGG-3' (SEC ID NO: 24) que corresponde a nt 119 a 164 de la secuencia de la cadena pesada de KRIX-1 (mayúsculas) que contiene dos nucleótidos alterados (g a t y t a g; cursiva y negrita).

La secuencia de longitud completa de scFv-KRIX-1VLVHQ con la etiqueta His(6) se describe en SEC ID NO: 25 y 26.

35 Clonación de scFv-KRIX-1VLVH y scFvKRIX-1VLVHQ(His) con la etiqueta His(6) en un vector de expresión CHO

40 La secuencia líder de la cadena ligera de KRIX-1 se introdujo en pPICZ C-scFv-KRIX-1VLVH(His) y pPICZ C-scFv-KRIX-1VLVHQ(His) clonando un fragmento de restricción HindIII/PstI de pCR4-KRIX-1L que contiene la secuencia líder en pPICZ C-scFv-KRIX-1VLVH y pPICZ C-KRIX-1VLVHQ, respectivamente, digeridos con HindIII/PstI. La secuencia de scFv resultante se adaptó con fines de clonación y de expresión mediante PCR usando los siguientes cebadores específicos:

Cebador directo: 5'-cccagcttgcgcccaccATGAAACCCCAGCKCA-GCTTC-3' (SEC ID NO:27) que corresponde al extremo 5' de la secuencia de la cadena ligera de KRIX-1 (mayúsculas), y que contiene un sitio *Hind*III (subrayado) y una secuencia Kozak (cursiva y negrita).

45 Cebador inverso: 5'-ccggaattcfaatgatgatgatgatgTGAGGAG-ACGGTGACCAGGGTTCC-3' (SEC ID NO:28) que corresponde al extremo 3' de la secuencia JH de la cadena pesada de KRIX-1 (mayúsculas), y que contiene un sitio *Eco*RI (subrayado), y una secuencia señal de parada (cursiva y negrita) y una secuencia de etiqueta His(6) (cursiva).

50 Los productos de la PCR resultantes se clonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega; Leiden, Países Bajos). Después de la verificación de las secuencias, los scFvKRIX-1VLVH(His) y scFv-KRIX-1VLVHQ(His) se clonaron en el vector pEE14.4 (Lonza Biologics, Portsmouth, NH). El vector resultante se linealizó con *Sa*II antes de la transfección.

El vector linealizado se usó para la transfección estable de células CKO-K1 usando el reactivo de transfección FuGENE6 (Roche, Bruselas, Bélgica) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se cultivaron en DMEM libre de glutamina (JRH Biosciences, Lenexa, KS) suplementado con FBS al 10%, Suplemento GS (JRH Biosciences, Lenexa, KS) y 50 mM de L-metionina sulfoximina (MSX) (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) para la selección.

Los mejores productores se adaptaron para crecer en medio libre de suero (medio libre de suero EX-CELL 302 sin L-Glutamina, JRH Biosciences, Lenexa, KS) – suplementado con Suplemento GS y MSX en la concentración respectiva – mediante reducción por etapas del FBS hasta 0%.

Los sobrenadantes se evaluaron para la producción de scFv-KRIX-1VLVH(His) y scFv-KRIX-1VLVHQ(His) en un ensayo cromogénico de FVIII como se describe en el ejemplo. En la Figura 15 se muestra la capacidad inhibitoria de FVIII del sobrenadante de cultivo.

Ejemplo 12. Competición entre el anticuerpo monoclonal humano RHD5 y KRIX-1

La estirpe celular de linfoblastoide humano RHD5 se derivó mediante inmortalización de linfocitos B procedentes de un paciente que desarrolló una respuesta autoinmunitaria a FVIII, según el procedimiento descrito (Jacquemin et al. (1998), Blood 92, 496-506). De forma breve, se resuspendieron 10^7 células mononucleares de sangre periférica en 2 ml de medio de cultivo, y se incubaron durante 2 horas a 37°C con 200 μ l de sobrenadante de virus de Epstein-Barr (cepa B95-8). Las células se sembraron entonces a 5.000 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) que contienen células alimentadoras (células 3T6-TRAP irradiadas con 7.000 rads). Se repusieron ciento cincuenta microlitros de sobrenadante de cultivo cada semana por medio de cultivo reciente. Tras 6 semanas, el sobrenadante del cultivo se ensayó en un ensayo inmunosorbente enlazado a enzima, en busca de la presencia de anticuerpos anti-FVIII. La estirpe celular positiva se transfirió a placas de 24 pocillos y se clonó inmediatamente a 60 células por placa de 96 pocillos sin células alimentadoras. Se seleccionó un clon, que produce un anticuerpo denominado RHD5.

La estirpe celular que produce el anticuerpo monoclonal RHD5 se depositó con el BCCM/LMBP (Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection) Laboratorium voor Moleculaire Biologie, Universidad de Gante, Technologiepark 927, B-9052 Zwijnaarde, Bélgica, en agosto de 2004, siendo el depositario D. Collen Research Foundation (Onderwijs & navorsing, Campus Gasthuisberg, Herestraat 49, B-3000 Lovaina, Bélgica) (número de acceso).

La secuenciación de los genes inmunoglobulínicos reordenados que codifican RHD5 se llevó a cabo como se describe en Jacquemin et al, Blood 1998, citado más arriba.

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de RHD5 se dan en SEC ID 29 a 32.

El anticuerpo presente en el sobrenadante del cultivo se purificó mediante adsorción sobre HiTRAP protein A (Pharmacia).

La actividad inhibitoria de KRIX-1 nativo y desglucosilado se evaluó en un ensayo de Bethesda (Kasper et al. (1975), citado más arriba) como se describe en el ejemplo 1. RHD5 inhibió sólo parcialmente la actividad de FVIII hasta la concentración más elevada ensayada. En un ensayo de Bethesda llevado a cabo mezclando un volumen de anticuerpo a 200 microgramos/ml o de tampón de control con un volumen de plasma, los niveles residuales de FVIII fueron $7,0 \pm 0,2$ y $251,9 \pm 18,8$ ng/ml, respectivamente (media \pm SD de triplicados). La inhibición de la actividad de FVIII alcanzada a una concentración final de RHD5 de 100 microgramos/ml fue por lo tanto 97%. De forma similar, en un ensayo de Bethesda llevado a cabo mezclando un volumen de anticuerpo a 200 microgramos/ml o de tampón de control con un volumen de FVIII recombinante de longitud completa (Recombinate^R, Baxter), los niveles residuales de FVIII fueron $8,0 \pm 0,2$ y $399,7 \pm 18,8$ ng/ml, respectivamente (media \pm SD de triplicados). La inhibición de la actividad de FVIII alcanzada a una concentración final de RHD5 de 100 microgramos/ml fue por lo tanto 98%.

La capacidad de KRIX-1 para competir con RHD5 por la unión a FVIII se ensayó en ELISA. Se incubaron placas de microtitulación de polystyrene toda la noche a 4°C con 50 μ l de RHD5 a 2 microgramos/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween. FVIII recombinante biotinilado (0,5 microgramos/ml) en Tris-BSA-Tween se mezcló con RHD5 o con Krix-1 a diversas concentraciones antes de la adición a placas revestidas con RHD5.

Después de un período de incubación de dos horas a 4°C, las placas se lavaron 4 veces y se detectó FVIII biotinilado unido mediante adición de avidina peroxidasa (Sigma) a 1 microgramo/ml. Después de 30 min. a RT, las placas se lavaron nuevamente y se suplementaron con 100 μ l de OPD. La OD resultante se leyó a 490 nm en un lector de microplacas Emax (Molecular Devices, Menlo Park, Ca).

FVIII biotinilado, usado en el experimento anterior, se preparó incubando FVIII recombinante (100 microgramos/ml) dializado en tampón de Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 10 mM, pH 8,5) con sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce) a 1 microgramo/ml durante 2 horas a RT. La preparación se dializó entonces frente a tampón de Hepes, y

se almacenó a -80°C.

Como se muestra en la figura 16, Krix-1 fue capaz de evitar completamente la unión de FVIII a RHD5. Esta competición entre Krix-1 y RHD5 muestra que el mezclado de los dos anticuerpos en diferentes relaciones permitirá la producción de mezclas de anticuerpos con actividad inhibidora que oscila entre la actividad inhibidora lograda con CHO-Krix-1 (85%) y la lograda con RHD5 (97-98%), de forma similar a las diferentes actividades inhibidoras logradas mezclando Krix-1 y Krix-1Q en el ejemplo 2. De forma similar, se predice que el mezclado de RHD5 y KRIX-1Q permite la producción de mezclas de anticuerpos con un intervalo muy amplio de actividades inhibidoras, que oscilan de 45% a 98%. También se puede predecir que el mezclado del fragmento Fab de KRIX-1Q con RHD5 debería permitir producir un intervalo incluso más amplio de mezclas inhibidoras, que oscila de 20% a 98%.

Ejemplo 13. Identificación de anticuerpos inhibidores alternativos para FVIII.

El presente ejemplo describe métodos identificar, partiendo de un primer anticuerpo inhibidor tal como Krix-1, se puede identificar un segundo anticuerpo adicional, basándose en el hecho de que compite con la unión de tal primer anticuerpo inhibidor tal como Krix-1. Preferiblemente, el anticuerpo identificado de esta manera es inhibidor, y además tiene un efecto de meseta (inhibidor parcial a un exceso molar (un exceso molar de 5, 10, 20, 50, o incluso 100 veces con respecto a FVIII)). El procedimiento descrito más abajo se puede llevar a cabo de forma similar usando RHD5 en lugar de Krix-1.

Esto se logra usando por ejemplo un ensayo en el que Krix-1 marcado (marcado radiactivamente o marcado con biotina o con un grupo cromóforo) está unido al Factor VIII. Se criban números elevados de anticuerpos no caracterizados en busca de su capacidad para destruir la unión de Krix-1 a FVIII. Como alternativa, los anticuerpos no caracterizados se incuban en primer lugar con FVIII insolubilizado en placas de microtitulación, y después se añade Krix-1 marcado y se ensaya para determinar su unión a FVIII. Como alternativa, Krix-1 y el segundo anticuerpo se mezclan juntos antes de ensayar la unión residual de Krix-1 a FVIII. Krix-1 que se usa en estos ensayos puede estar glucosilado, parcialmente glucosilado o completamente desglucosilado (tratamiento enzimático amplio o mutagénesis dirigida al sitio en posiciones esenciales en la secuencia de consenso de glucosilación). Krix-1 que se usa en estos ensayos puede estar intacto, puede ser un fragmento F(ab)₂, un fragmento F(ab), un fragmento scFvscFv, u otro fragmento de Krix-1 con la capacidad para unirse al dominio C1 de FVIII.

Usando estos ensayos, se pueden identificar anticuerpos que afectan a la unión de Krix-1 al dominio C1 de FVIII. Esta alteración se puede lograr mediante un anticuerpo dirigido al mismo epítipo en el dominio C1 como para Krix-1, mediante un anticuerpo dirigido a otro epítipo que es aquel de Krix-1 en el dominio C1, o mediante un anticuerpo con un epítipo fuera del dominio C1 pero que compite estéricamente con la unión del anticuerpo Krix-1 a su epítipo en el dominio C1. En este contexto, es más probable que un ensayo en el que se usa un Krix-1 intacto que está muy glucosilado genere anticuerpos que interfieren con Krix-1 que un fragmento de Krix-1 o Krix-1 desglucosilado.

El cribado de anticuerpos se puede iniciar, por ejemplo, cribando en primer lugar una librería de scFv en busca de fragmentos de scFv que se unen a FVIII humano, y más particularmente que se unen al dominio C1 del Factor VIII. Para esta técnica, los fragmentos de anticuerpos se han presentado sobre la superficie de fagos filamentosos que codifican los genes del anticuerpo (Hoogenboom y Winter (1992) *J Mol Biol.* 227, 381-388; Vaughan et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14, 309-314; Tomlinson et al. (1992) *Hum Mol Genet.* 3, 853-860; Nissim et al. (1994) *EMBO J.* 13, 692-698; Griffiths et al. (1994) *EMBO J.* 12, 725-734). Se han desarrollado en fagos librerías de inmunoglobulinas de cadena pesada (VH) variable y cadena ligera (VL) variable. Estos fagos se pueden seleccionar mediante adsorción con anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos codificados se pueden segregar entonces como fragmentos solubles a partir de bacterias infectadas. Esta presentación de anticuerpos en fagos, y la selección con antígeno, imita la selección inmunitaria, y se puede usar para obtener anticuerpos sin inmunización partiendo de una única librería de fagos (Hoogenboom y Winter (1992) *J Mol Biol.* 227, 381-388). Se obtuvo una librería de VH y VscFv sintética humana reclonando las regiones variables de las cadenas pesada y ligera procedentes de vectores de librería lox, en el que los genes V de las cadenas pesada y ligera se reordenan al azar y se clonan para la presentación como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) sobre la superficie de fago filamentosos (Griffiths et al. (1994) *EMBO J.* 12, 725-34) [Centre for Protein Engineering de Dr. G. Winter, LMB-MRC, Cambridge, UK] en el vector fagómico pHEN2.

Usando tal librería, se pueden identificar fragmentos de anticuerpos que compiten con la unión de un anticuerpo tal como Krix-1 a FVII. Después, estos fragmentos se pueden cribar en busca de su afinidad de unión a FVIII, y subsiguientemente en busca de su capacidad para inhibir la actividad de FVIII y para determinar la presencia de un efecto de meseta de la inhibición de la actividad de FVIII en un exceso molar. Considerando el tamaño de los fragmentos, se prevé que el aumento del tamaño de estos fragmentos, mediante clonación de estos fragmentos scFv en un anticuerpo completo, dará como resultado una capacidad inhibidora incrementada. Según la invención, la glucosilación del fragmento scFv recientemente identificado y del anticuerpo correspondiente también se puede modificar usando las técnicas descritas en la presente invención. Como alternativa, los anticuerpos aislados de patente de hemofilia, o más generalmente cualquier anticuerpo existente, se pueden ensayar en busca de su capacidad para competir con un anticuerpo tal como Krix-1 o RHD5.

Los anticuerpos o fragmentos que se han obtenido usando el ensayo mencionado anteriormente se ensayan en

busca de su efecto inhibitor sobre la actividad de FVIII y/o en busca de su capacidad para destruir un complejo entre FVIII y por ejemplo vWF. Además, los anticuerpos inhibidores o fragmentos se criban entonces en busca de la presencia de inhibición parcial de FVIII en exceso fisiológico ("efecto de meseta").

5 Cualquier segundo anticuerpo que compite con la unión a Krix-1 se puede usar en mezclas con Krix-1 nativo o un fragmento nativo de Krix-1, o Krix-1 o un fragmento con glucosilación modificada para obtener una inhibición de la actividad de FVIII que es menor que Krix-1 si el segundo anticuerpo no tiene actividad inhibitor, o tiene un efecto de meseta que es menor que el de Krix-1. Como alternativa, mezclas entre Krix-1 nativo o un fragmento nativo de Krix-1, o Krix-1 o un fragmento con glucosilación modificada y un segundo anticuerpo dan como resultado una inhibición de la actividad de FVIII que es mayor que Krix-1 o su fragmento si el segundo anticuerpo tiene una actividad totalmente inhibitor, o tiene un efecto de meseta que es mayor que el de Krix-1. Igualmente, en estas mezclas, el segundo anticuerpo se puede sustituir por un fragmento de un segundo anticuerpo, tal como un fragmento F(ab)₂, Fab, scFv u otro fragmento, o puede tener una glucosilación modificada en la región variable, si se produce en tal segundo anticuerpo.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Collen Research Foundation VZW Jacquemin, Marc Saint-Remy, Jean-Marie

<120> anticuerpos variables

<130> C2949-PCT

<150> GB 0319118.6

<151> 18/08/2003

20 <150> GB 0319345.5

<151> 18/08/2003

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

25 <211> 496

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(495)

<223> región variable de la cadena pesada de KRIX-1

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(57)

35 <223> secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder

<220>

<221> característica diversa

<222> (133)..(192)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

40 <220>

<221> característica diversa

ES 2 412 489 T3

<222> (235)..(285)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

<220>

<221> característica diversa

5 <222> (382)..(435)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

<400> 1

atg gac tgg acc tgg agg atc ctc ttc ttg gtg gca gca gcc aca gga	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gcc cac tcc cag gtg caa ctg gtg caa tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag acc tct gga tac aac ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Asn Phe	
35 40 45	
acc ggc tac tct gct tct gga cat atc ttc acc gcc tac tct gtg cac	192
Thr Gly Tyr Ser Ala Ser Gly His Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Val His	
50 55 60	
tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga agg atc	240
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
aac cct aac agt ggt gcc aca gac tat gca cat aaa ttt cag ggc agg	288
Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Asp Tyr Ala His Lys Phe Gln Gly Arg	
85 90 95	
gtc acc atg tcc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac atg gaa ctg	336
Val Thr Met Ser Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu	
100 105 110	
agc agg ctg aca tct gac gac acg gcc atg tat tac tgt gcg aga gcc	384
Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala	
115 120 125	
gac aac tat ttc gat att gtg act ggc tat act tct cat tac ttt gac	432
Asp Asn Tyr Phe Asp Ile Val Thr Gly Tyr Thr Ser His Tyr Phe Asp	
130 135 140	
tac tgg ggc cgg gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag	480
Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys	
145 150 155 160	
ggc cca tcg gtc ttc c	496
Gly Pro Ser Val Phe	
165	

<210> 2

10 <211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(57)

<223> secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder

<220>

5 <221> característica diversa

<222> (133)..(192)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (235)..(285)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

<220>

<221> característica diversa

<222> (382)..(435)

15 <223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

<400> 2

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

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

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

ES 2 412 489 T3

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile
65 70 75 80

Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Asp Tyr Ala His Lys Phe Gln Gly Arg
85 90 95

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

Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala
115 120 125

Asp Asn Tyr Phe Asp Ile Val Thr Gly Tyr Thr Ser His Tyr Phe Asp
130 135 140

Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
145 150 155 160

Gly Pro Ser Val Phe
165

<210> 3

<211> 429

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(429)

<223> región variable de la cadena ligera de KR1X-1

10 <220>

<221> característica diversa

<222> (130)..(164)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

<220>

15 <221> característica diversa

<222> (211)..(231)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

<220>

<221> característica diversa

20 <222> (328)..(357)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(60)

<223> secuencia nucleotídica que codifica el péptido líder

<400> 3

atg gaa acc cca gct cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca	48
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro	
1 5 10 15	
gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct	96
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser	
20 25 30	
ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt	144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
35 40 45	
gtt gcc agc gcc tac tta gcc tgg tac cag caa aaa cct ggc cag gct	192
Val Ala Ser Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	
50 55 60	
ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agt agg gcc acc gac atc cca	240
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Asp Ile Pro	
65 70 75 80	
cac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc	288
His Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
85 90 95	
agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tac tac tgt cag caa tat	336
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr	
100 105 110	
ggt acc tca gcc tta ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc	384
Gly Thr Ser Ala Leu Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile	
115 120 125	
aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct	429
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser	
130 135 140	

5 <210> 4

<211> 143

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> característica diversa

<222> (130)..(164)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

<220>

<221> característica diversa

15 <222> (211)..(231)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

<220>

<221> característica diversa

<222> (328)..(357)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

<220>

<221> característica diversa

5 <222> (1)..(60)

<223> secuencia nucleotídica que codifica el péptido líder

<400> 4

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

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

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ala Ser Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

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

His Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Thr Ser Ala Leu Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

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

<210> 5

10 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo de la cadena pesada de Krix-1

15 <400> 5

cggggtacc caccatggac tggacctgga ggatc 35

<210> 6

<211> 40

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador inverso de la cadena pesada de Krix-1
5 <400> 6
tatggccgac gtcgactcat ttaccggag acagggagag 40
<210> 7
<211> 34
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador directo de la cadena ligera de Krix-1
<400> 7
ccaagcttc caccatgaa accccagckc agct 34
15 <210> 8
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> cebador inverso de la cadena ligera de Krix-1
<400> 8
aacagcctc tagactaaca ctctcccctg ttgaag 36
<210> 9
<211> 46
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador mutagénico directo de Krix-1 Asn47Gln
<400> 9
30 cctgaagac ctctggatac caattcaccg gctactctgc ttctgg 46
<210> 10
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Cebador mutagénico inverso de Krix-1 Asn47Gln
<400> 10

ccagaagcag agtagccggt gaattggtat ccagaggtct tgcagg 46
<210> 11
<211> 37
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador mutagénico directo de Krix-1 Thr49Ala
<400> 11
cctctggata caacttcgct ggctactctg cttctgg 37
10 <210> 12
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Cebador mutagénico inverso de Krix-1 Thr49Ala
<400> 12
ccagaagcag agtagccagc gaagttgtat ccagagg 37
<210> 13
<211> 46
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador mutagénico directo de Krix-1 Asn47Glu
<400> 13
25 cctgcaagac ctctggatac gagttcaccc gctactctgc ttctgg 46
<210> 14
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Cebador mutagénico inverso de Krix-1 Asn47Glu
<400> 14
ccagaagcag agtagccggt gaactcgat ccagaggtct tgcagg 46
<210> 15
35 <211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador mutagénico directo de Krix-1 Asn47Asp
<400> 15
cctgcaagac ctctggatac gacttcaccg gctactctgc ttctgg 46
5 <210> 16
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Cebador mutagénico inverso de Krix-1 Asn47Asp
<400> 16
ccagaagcag agtagccggt gaagtcgtat ccagaggtct tgcagg 46
<210> 17
<211> 45
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador directo de scFv-KRix-1VL
<400> 17
20 gtatctctcg agaaaagaga aattgtgtg acgcagtctc caggc 45
<210> 18
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> cebador inverso de scFv-KRix-1VL
<400> 18
cgccagagcc acctccgct gaaccgctc cacctcgtt gatctccacc ttggtc 56
<210> 19
30 <211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador directo de scFv-KRix-1VH
35 <400> 19
caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cgcaggtmca gctggtgcag tctggg 56
<210> 20

<211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> cebador inverso de scFv-KRix-1VH
 <400> 20
 gatctctaga tgaggagacg gtgaccaggg ttcc 34
 <210>21
 <211> 45
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo de scFv-KRIX-1VLVH con etiqueta His(6)
 <400> 21
 15 gatctctcgc agaaaagaga aattgtgtg acgcagtctc caggc 45
 <210> 22
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador inverso de scFv-KRIX-1VLVH con etiqueta His(6)
 <400> 22
 catggtcgac tgaggagacg gtgaccaggg ttccccggcc 40
 <210> 23
 25 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo de scFv-Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)
 30 <400> 23
 cctgcaagac ctctggatac caattcaccg gctactctgc ttctgg 46
 <210> 24
 <211> 46
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso de scFv- Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)

ES 2 412 489 T3

<400> 24

ccagaagcag agtagccggt gaattggtat ccagaggtct tgcagg 46

<210> 25

<211> 867

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv-Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)

<220>

10 <221 > CDS

<222> (1)..(867)

<223>

<400> 25

atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca	48
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro	
1 5 10 15	
gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct	96
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser	
20 25 30	
ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt	144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
35 40 45	
gtt gcc agc gcc tac tta gcc tgg tac cag caa aaa cct ggc cag gct	192
Val Ala Ser Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	
50 55 60	
ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agt agg gcc acc gac atc cca	240
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Asp Ile Pro	
65 70 75 80	

ES 2 412 489 T3

cac His	agg Arg	ttc Phe	agt Ser	ggc Gly 85	agt Ser	ggg Gly	tct Ser	ggg Gly	aca Thr 90	gac Asp	ttc Phe	act Thr	ctc Leu	acc Thr 95	atc Ile	288
agc Ser	aga Arg	ctg Leu	gag Glu 100	cct Pro	gaa Glu	gat Asp	ttt Phe	gca Ala 105	gtg Val	tac Tyr	tac Tyr	tgt Cys	cag Gln 110	caa Gln	tat Tyr	336
ggc Gly	acc Thr	tca Ser 115	gcc Ala	tta Leu	ctc Leu	act Thr	ttc Phe 120	ggc Gly	gga Gly	ggg Gly	acc Thr	aag Lys 125	gtg Val	gag Glu	atc Ile	384
aaa Lys	cga Arg 130	ggc Gly	gga Gly	ggc Gly	ggc Gly	tca Ser 135	ggc Gly	gga Gly	ggc Gly	ggc Gly	tct Ser 140	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	gga Gly	432
tgc Ser 145	cag Gln	gta Val	cag Gln	ctg Leu	gtg Val 150	cag Gln	tct Ser	ggg Gly	gct Ala	gag Glu 155	gtg Val	aag Lys	aag Lys	cct Pro	ggg Gly 160	480
gcc Ala	tca Ser	gtg Val	aag Lys	gtc Val 165	tcc Ser	tgc Cys	aag Lys	acc Thr	tct Ser 170	gga Gly	tac Tyr	caa Gln	ttc Phe	acc Thr 175	ggc Gly	528
tac Tyr	tct Ser	gct Ala	tct Ser 180	gga Gly	cat His	atc Ile	ttc Phe	acc Thr 185	gcc Ala	tac Tyr	tct Ser	gtg Val	cac His 190	tgg Trp	gtg Val	576
cga Arg	cag Gln	gcc Ala 195	cct Pro	gga Gly	caa Gln	ggg Gly	ctt Leu 200	gag Glu	tgg Trp	atg Met	gga Gly	agg Arg 205	atc Ile	aac Asn	cct Pro	624
aac Asn 210	agt Ser	ggc Gly	gcc Ala	aca Thr	gac Asp	tat Tyr 215	gca Ala	cat His	aaa Lys	ttt Phe	cag Gln 220	ggc Gly	agg Arg	gtc Val	acc Thr	672
atg Met 225	tcc Ser	agg Arg	gac Asp	acg Thr	tcc Ser 230	atc Ile	agc Ser	aca Thr	gcc Ala	tac Tyr 235	atg Met	gaa Glu	ctg Leu	agc Ser	agg Arg 240	720
ctg Leu	aca Thr	tct Ser	gac Asp 245	gac Asp	aca Thr	gcc Ala	atg Met	tat Tyr	tac Tyr 250	tgt Cys	gcg Ala	aga Arg	gcc Ala	gac Asp 255	aac Asn	768
tat Tyr	ttc Phe	gat Asp	att Ile 260	gtg Val	act Thr	ggc Gly	tat Tyr	act Thr 265	tct Ser	cat His	tac Tyr	ttt Phe	gac Asp 270	tac Tyr	tgg Trp	816
ggc Gly	cgg Arg	gga Gly 275	acc Thr	ctg Leu	gtc Val	acc Thr	gtc Val 280	tcc Ser	tca Ser	cat His	cat His	cat His 285	cat His	cat His	cat His	864
tga																867

<210> 26

<211> 288

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv-Asn47Gln KRIX-1VLVH(His)

<400> 26

ES 2 412 489 T3

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

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

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ala Ser Ala Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

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

His Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Thr Ser Ala Leu Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
145 150 155 160

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Gln Phe Thr Gly
165 170 175

Tyr Ser Ala Ser Gly His Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Val His Trp Val
180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asn Pro
195 200 205

Asn Ser Gly Ala Thr Asp Tyr Ala His Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
210 215 220

Met Ser Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg
225 230 235 240

Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asp Asn
245 250 255

ES 2 412 489 T3

Tyr Phe Asp Ile Val Thr Gly Tyr Thr Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp
260 265 270

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His
275 280 285

<210> 27

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo de CHO-scFvKRIX-1VLVHQ(His)

<400> 27

cccaagcttg ccgccacat ggaaaccca gckcagcttc 40

10 <210> 28

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador inverso de CHO-scFvKRIX-1VLVHQ(His)

<400> 28

ccggaattct caatgatgat gatgatgatg ttaggagacg gtgaccaggg ttcc 54

<210> 29

<211> 450

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(450)

25 <223> región variable de la cadena pesada de RHD5

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(60)

<223> secuencia nucleotídica que codifica el péptido líder

30 <220>

<221> característica diversa

<222> (133)..(162)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

<220>

<221> característica diversa

<222> (205)..(255)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

5

<220>

<221> característica diversa

<222> (352)..(384)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

<400> 29

atg gac tgg acc tgg agg ttc ctc ttt gtg gtg gca gca gct gca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Ala Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
ccc ggg tcg tcg gtg atg gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc	144
Pro Gly Ser Ser Val Met Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe	
35 40 45	
agc agc ttt ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Ser Ser Phe Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg gtg gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac acc gca	240
Glu Trp Val Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Thr Ala	
65 70 75 80	
cgg aac ttc cag aat aga gtc acc att acc gcg gac gaa ttc acg agc	288
Arg Asn Phe Gln Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Phe Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tac ata cga ctg agg agc ctg aga tct gaa gat acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Ile Arg Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gtc ggc ggt cga gat gcc tac agc ttt gat ggt ttt gat	384
Tyr Tyr Cys Val Gly Gly Arg Asp Ala Tyr Ser Phe Asp Gly Phe Asp	
115 120 125	
gtc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tca gcc tcc acc aag	432
Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys	
130 135 140	
ggc cca tcg gtc ttc ccc	450
Gly Pro Ser Val Phe Pro	
145 150	

10

<210> 30

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(60)

<223> secuencia nucleotídica que codifica el péptido líder

<220>

5 <221> característica diversa

<222> (133)..(162)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (205)..(255)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

<220>

<221 > característica diversa

<222> (352)..(384)

15 <223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

<400> 30

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

<210> 31

<211> 420

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(420)

<223> región variable de la cadena ligera de RHD5

10 <220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(60)

<223> secuencia nucleotídica que codifica el péptido líder

<220>

15 <221> característica diversa

<222> (124)..(156)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

<220>

<221> característica diversa

<222> (202)..(222)

5 <223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

<220>

<221> característica diversa

<222> (316)..(348)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

10 <400> 31

atg	gca	tgg	atc	cct	ctc	ttc	ctc	ggc	gtc	ctt	ggt	tac	tgc	aca	gga	48
Met	Ala	Trp	Ile	Pro	Leu	Phe	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Tyr	Cys	Thr	Gly	
1				5					10					15		
tcc	gtg	gcc	tcc	tct	ggg	ctg	act	cag	cca	cac	tca	gtg	tcc	gtg	tcc	96
Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	His	Ser	Val	Ser	Val	Ser	
			20					25					30			
cca	gga	cag	aca	gcc	aac	atc	acc	tgc	tct	aga	gat	aag	ttg	ggt	cat	144
Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Arg	Asp	Lys	Leu	Gly	His	
		35					40					45				
aaa	ttt	gct	tcc	tgg	tat	caa	cag	aag	cca	ggc	cag	tcc	cct	gct	ctt	192
Lys	Phe	Ala	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	
	50					55					60					
ctc	atc	tat	caa	gac	agc	aag	cgg	ccc	tca	ggg	atc	cct	gag	cga	ttc	240
Leu	Ile	Tyr	Gln	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	
65					70					75					80	
tct	ggc	tcc	aac	tct	ggg	aac	aca	gcc	act	ctg	acc	atc	agc	ggg	acc	288
Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	
				85					90					95		
cag	gct	atg	gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	cag	gcg	tgg	gac	aac	acc	336
Gln	Ala	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Asn	Thr	
			100					105					110			
act	gcc	gta	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	ttg	aca	gtc	cta	agt	cag	ccc	384
Thr	Ala	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Pro	
		115					120					125				
aag	gct	gcc	ccc	tcg	gtc	act	ctg	ttc	ccg	ccc	tcc					420
Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser					
	130					135					140					

<210> 32

<211> 140

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(60)

<223> secuencia nucleotídica que codifica el péptido líder

<220>

<221> característica diversa

<222> (124)..(156)

5 <223> secuencia nucleotídica que codifica CDR1

<220>

<221> característica diversa

<222> (202)..(222)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR2

10 <220>

<221> característica diversa

<222> (316)..(348)

<223> secuencia nucleotídica que codifica CDR3

<400> 32

Met Ala Trp Ile Pro Leu Phe Leu Gly Val Leu Val Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Ser Gly Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Val Ser
20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Asn Ile Thr Cys Ser Arg Asp Lys Leu Gly His
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Ala Leu
50 55 60

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

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
85 90 95

Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Asn Thr
100 105 110

Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro
115 120 125

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

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo inhibidor modificado contra el Factor VIII (FVIII) o su fragmento de unión a antígeno,

- en el que el anticuerpo inhibidor no modificado comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO:2, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO:4, respectivamente, y

- en el que el anticuerpo inhibidor no modificado se produce mediante expresión en una estirpe celular de linfoblastoide humano, caracterizada por que dicha modificación es una desglucosilación total o parcial en la posición Asn 47 de SEC ID NO:2 en la secuencia de consenso de glucosilación de la cadena pesada variable, y en el que el anticuerpo no modificado tiene una actividad inhibidora disminuida frente al Factor VIII en comparación con el anticuerpo inhibidor no modificado.

2. El anticuerpo o el fragmento según la reivindicación 1, en el que la secuencia de consenso de glucosilación en las posiciones 47 a 49 de SEC ID NO: 2 está mutada por una mutación de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2 en cualquier aminoácido y/o un cambio de Thr en la posición 49 de SEC ID NO: 2 en cualquier otro aminoácido diferente de serina.

3. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 2, en el que la mutación es el cambio de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2 a Gln, Glu o Asp, y/o en el que la mutación es el cambio de Thr en la posición 49 de SEC ID NO: 2 a Ala.

4. El anticuerpo o el fragmento según la reivindicación 1, en el que la desglucosilación completa o parcial es una desglucosilación de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2.

5. El fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un fragmento scFv, un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

6. El fragmento según la reivindicación 5, en el que el fragmento scFv está representado por los aminoácidos 21 a 282 de SEC ID NO: 26.

7. El anticuerpo o el fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo inhibidor no modificado contra FVIII tiene una secuencia de cadena pesada variable como se representa mediante los aminoácidos 20 a 165 de SEC ID NO: 2, y una secuencia de cadena ligera variable como se representa mediante los aminoácidos 21 a 143 de SEC ID NO: 4.

8. El anticuerpo o el fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo inhibidor no modificado contra FVIII es el anticuerpo como se obtiene a partir de la estirpe celular Krix-1 depositada como LMBP 5089CB.

9. Una mezcla de:

- el anticuerpo inhibidor modificado o el fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y

- el anticuerpo inhibidor no modificado o su fragmento de unión a antígeno, que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO: 2, respectivamente, y que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO: 4, respectivamente, y cuyo anticuerpo inhibidor no modificado o su fragmento de unión a antígeno se produce mediante expresión en una estirpe celular de linfoblastoide humano.

10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o su fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o que comprende la mezcla según la reivindicación 9.

11. Un anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una mezcla según la reivindicación 9, para tratar o prevenir un trastorno tromboembólico, incluyendo, pero sin limitarse a, la prevención de trombosis de venas profundas, embolia pulmonar como consecuencia de intervención quirúrgica, o trombofilia hereditaria crónica, o trombofilia adquirida, y tratar trombosis de venas profundas, embolia pulmonar, apoplejía, fibrilación ventricular, infarto de miocardio no de onda Q, infarto de miocardio elevado no ST, angina inestable, septicemia o SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica).

12. Uso de un anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una mezcla según la reivindicación 9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno tromboembólico, incluyendo, pero sin limitarse a, prevención de la trombosis de venas profundas, embolia pulmonar como consecuencia de intervención quirúrgica, o trombofilia hereditaria crónica, o trombofilia adquirida, y para el

tratamiento de trombosis de venas profundas, embolia pulmonar, apoplejía, fibrilación ventricular, infarto de miocardio no de onda Q, infarto de miocardio elevado no ST, angina inestable, septicemia o SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), en el que dicho medicamento comprende además, para administración concomitante, un fármaco o fármacos para inhibir la agregación plaquetaria, tal como aspirina.

5 13. El uso según la reivindicación 12, para el tratamiento de un infarto de miocardio agudo, en el que dicho medicamento comprende además, para administración concomitante, un fármaco o fármacos para inhibir la agregación plaquetaria, tal como abciximab, o comprende además un agente trombolítico, tal como activador de plasminógeno tisular, estafilocinasa o microplasmina.

10 14. Un método *in vitro* para obtener una librería de al menos dos anticuerpos inhibidores contra el factor VIII con actividad inhibidora máxima variable, comprendiendo dicho método las etapas de:

15 - proporcionar un anticuerpo inhibidor glucosilado contra FVIII o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO: 2, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO: 4,

- modificar la glucosilación de Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2, y

- seleccionar al menos un anticuerpo o fragmento que tiene una actividad inhibidora máxima diferente.

20 15. El método de la reivindicación 14, que comprende además la etapa de seleccionar aquellos anticuerpos o fragmentos para los cuales la afinidad no se ve sustancialmente afectada.

16. Un método *in vitro* para producir un anticuerpo inhibidor contra FVIII o un fragmento de unión a antígeno del mismo, inhibiendo dicho anticuerpo o fragmento a FVIII entre 20 y 85% a concentración saturante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, comprendiendo dicho método las etapas de:

25 - proporcionar un anticuerpo inhibidor intacto contra FVIII o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 64, 79 a 95 y 128 a 145 de SEC ID NO: 2, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 44 a 55, 71 a 77 y 110 a 119 de SEC ID NO: 4,

30 - modificar la glucosilación en Asn en la posición 47 de SEC ID NO: 2,

- evaluar la capacidad de dicho anticuerpo inhibidor modificado o de dicho fragmento para inhibir FVIII entre 20 y 85% a concentración saturante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

17. Una mezcla que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y que comprende otro anticuerpo que es un anticuerpo inhibidor contra FVIII.

35 18. La mezcla según la reivindicación 17, en la que dicho otro anticuerpo es el anticuerpo que comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 45 a 54, 69 a 85 y 118 a 128 de SEC ID NO: 30, respectivamente, y comprende como regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable las secuencias de aminoácidos representadas por los aminoácidos 42 a 52, 68 a 74 y 106 a 116 de SEC ID NO: 32, respectivamente.

40 19. La mezcla según la reivindicación 9, 17 ó 18, en la que dichos anticuerpos se mezclan juntos en una relación apropiada para lograr una inhibición máxima dada de la actividad de FVIII, cualquiera que sea el exceso de la mezcla de anticuerpos con respecto a FVIII.

20. Una composición farmacéutica que comprende la mezcla según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.

45

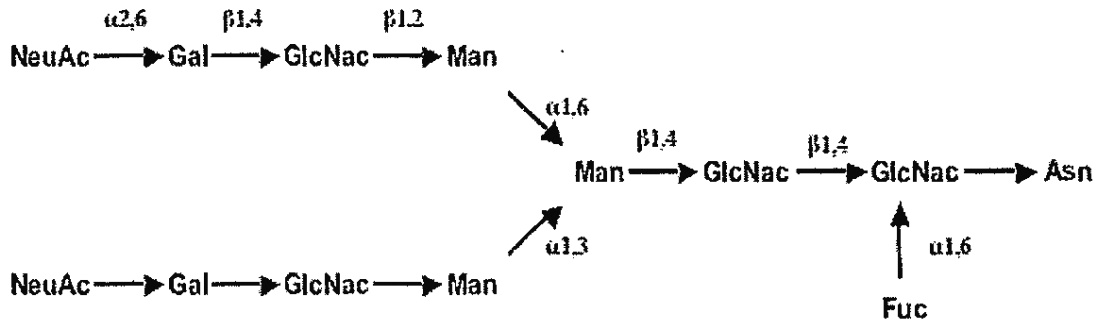
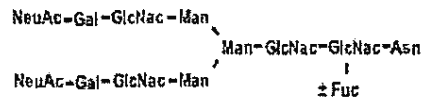


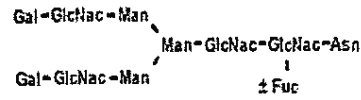
Figura 1

nativa



Tratamiento enzimático

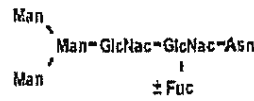
Sialidasa



Sialidasa
B-galactosidasa



Sialidasa
B-galactosidasa
N-acetilglucosaminidasa



Sialidasa
B-galactosidasa
N-acetilglucosaminidasa
 α -manosidasa

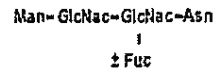


Figura 2

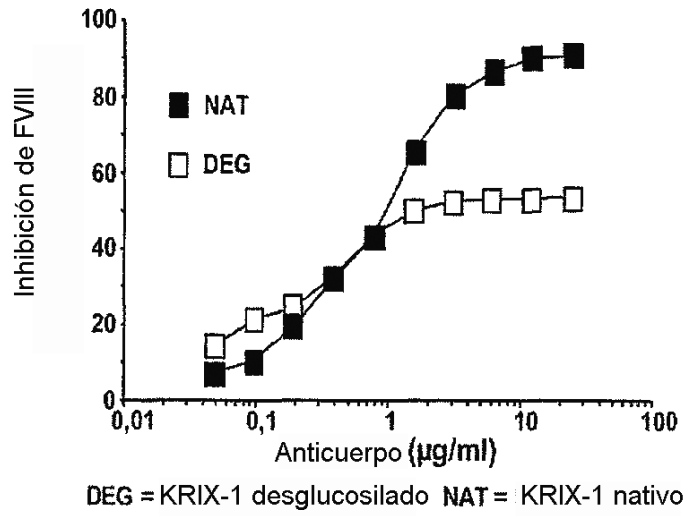


Figura 3

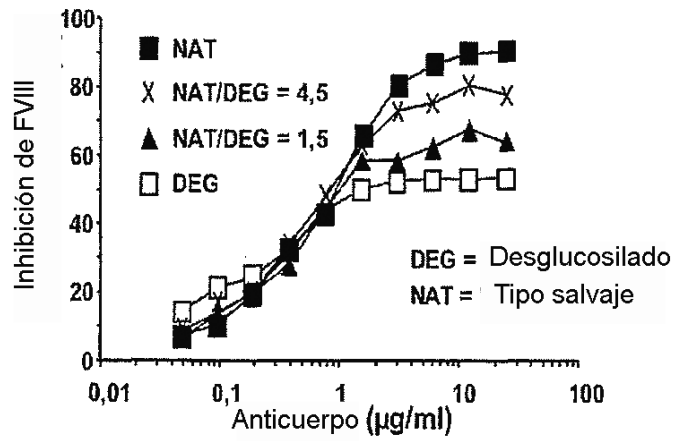


Figura 4

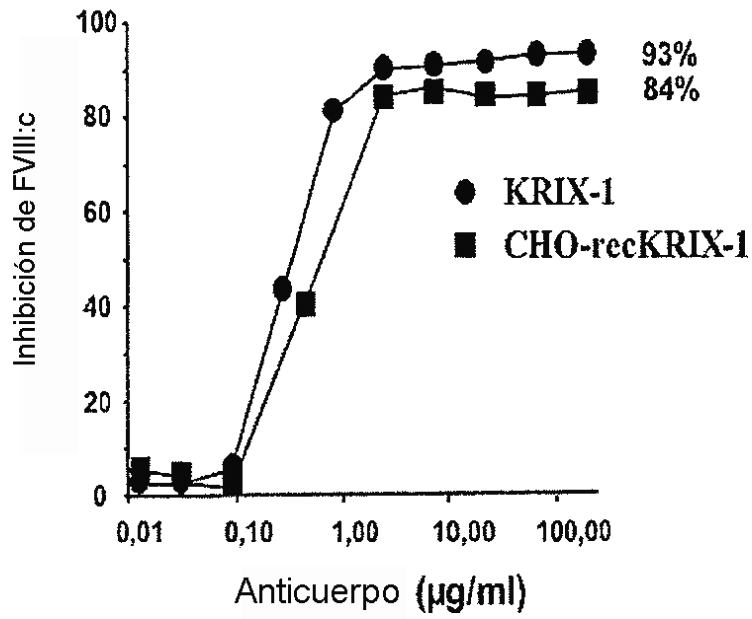


Figura 5

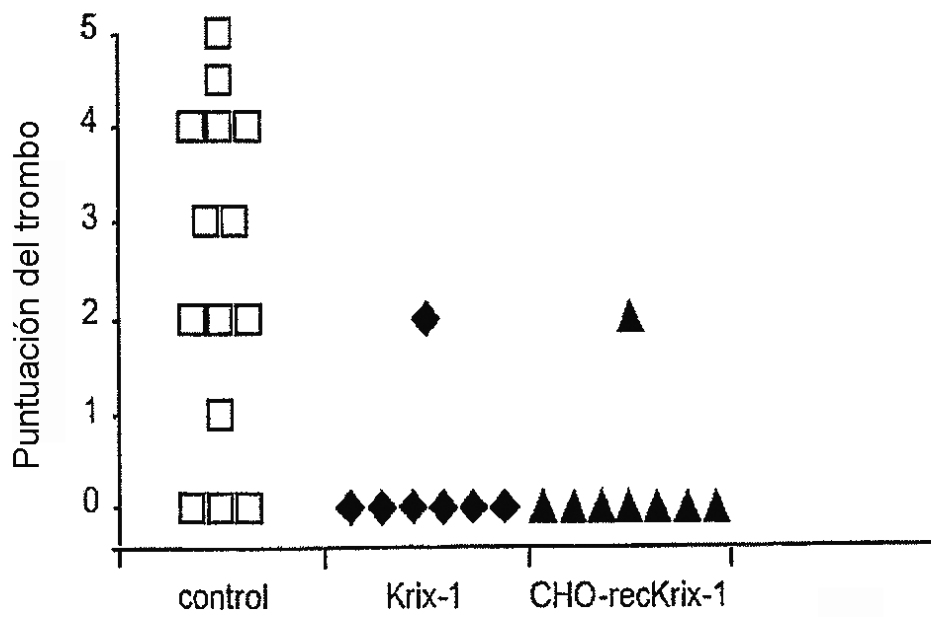


Figura 6

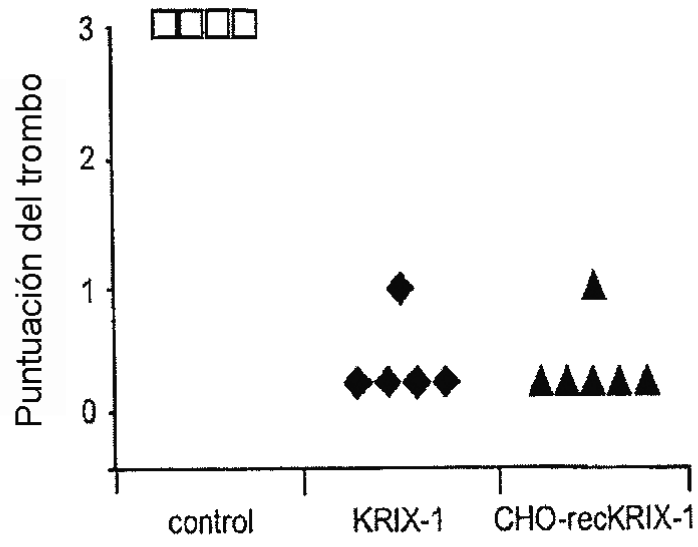


Figura 7

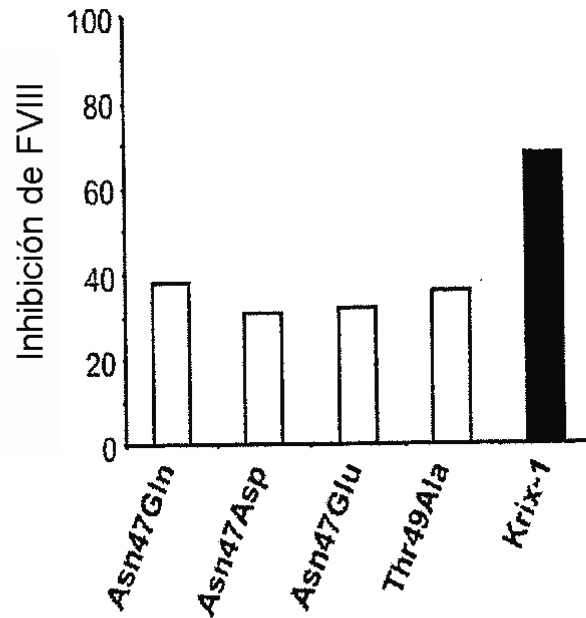


Figura 8

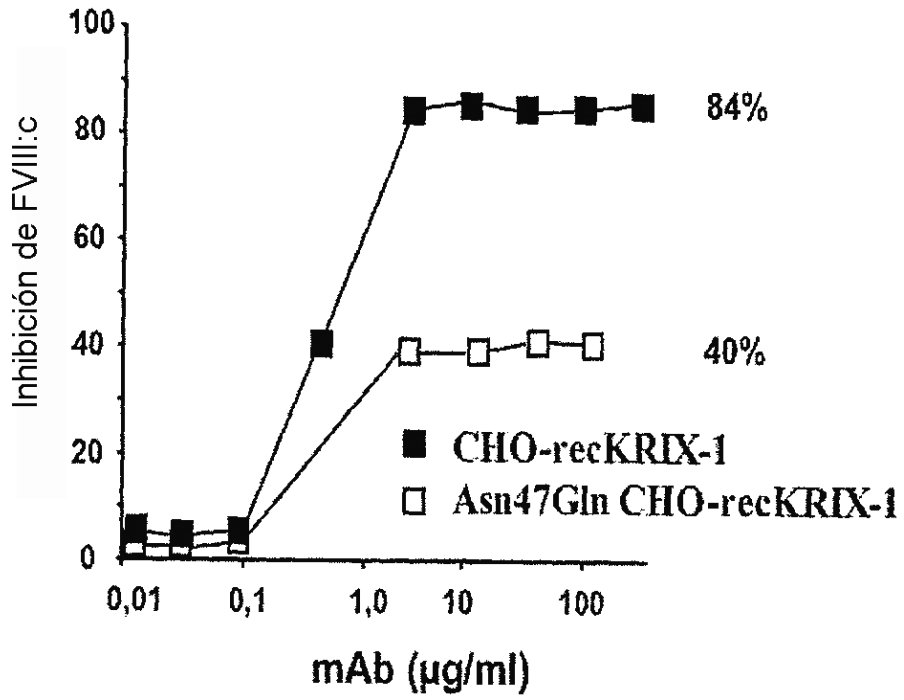


Figura 9

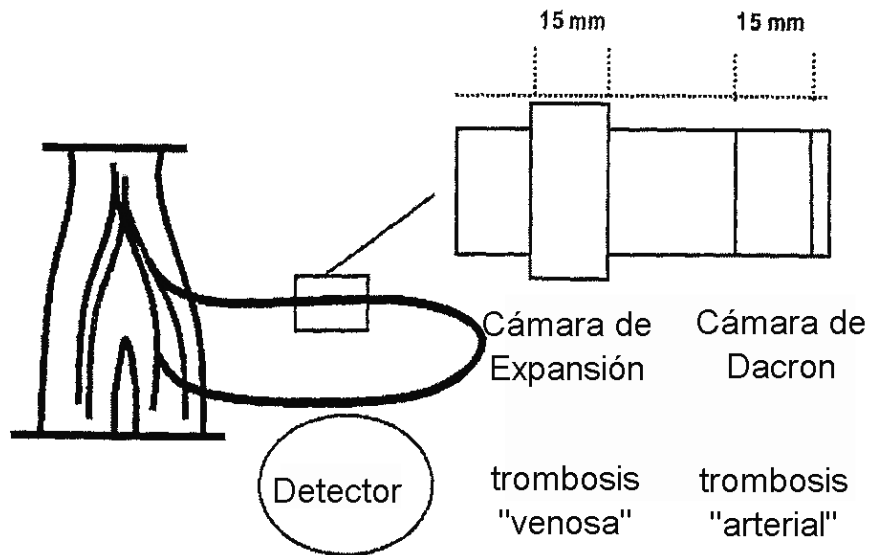


Figura 10

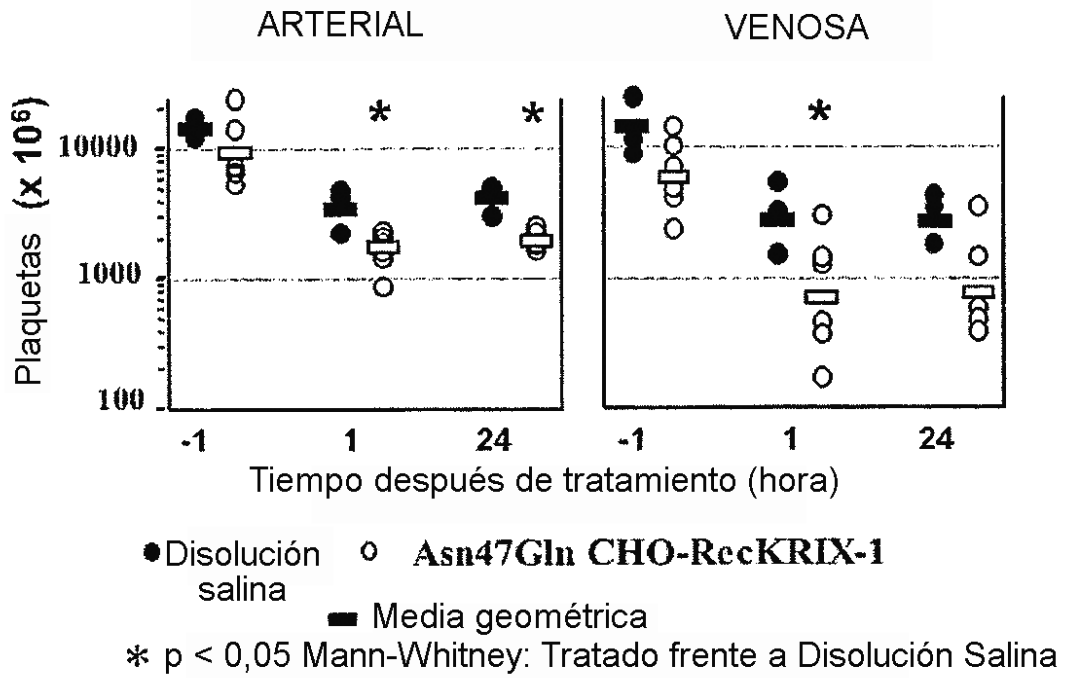


Figura 11

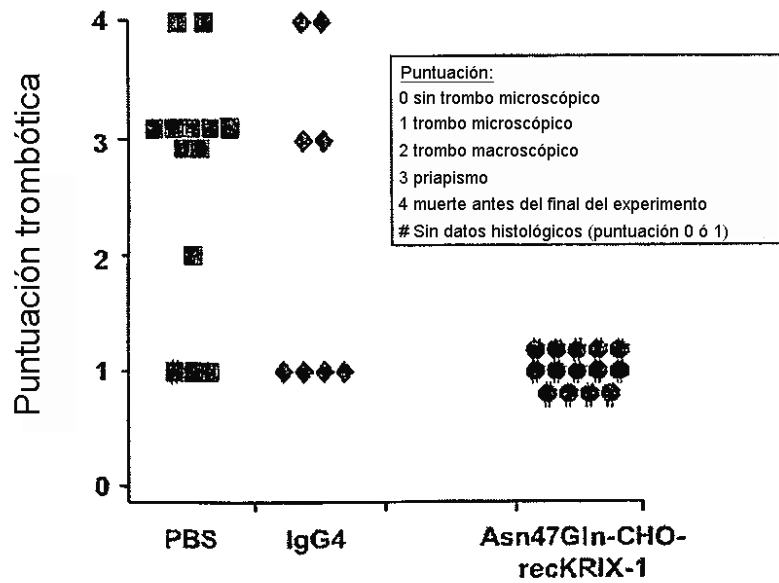


Figura 12

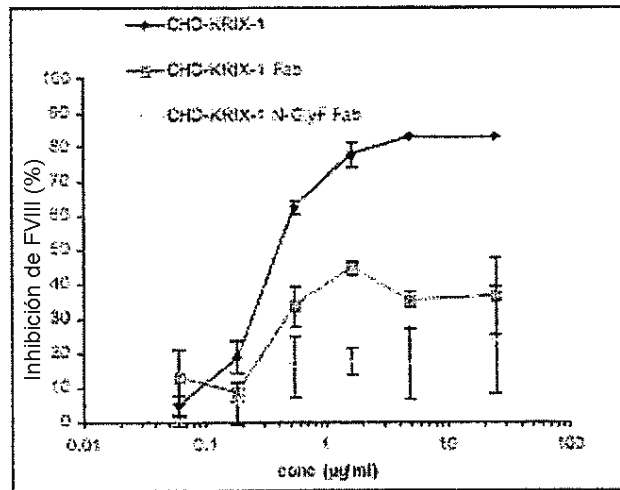
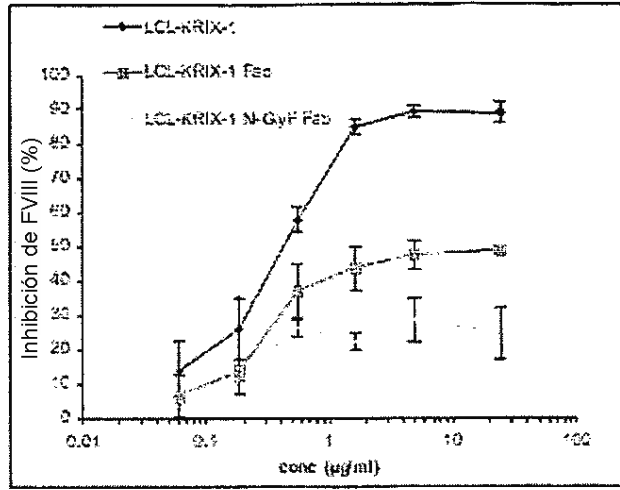


Figura 13

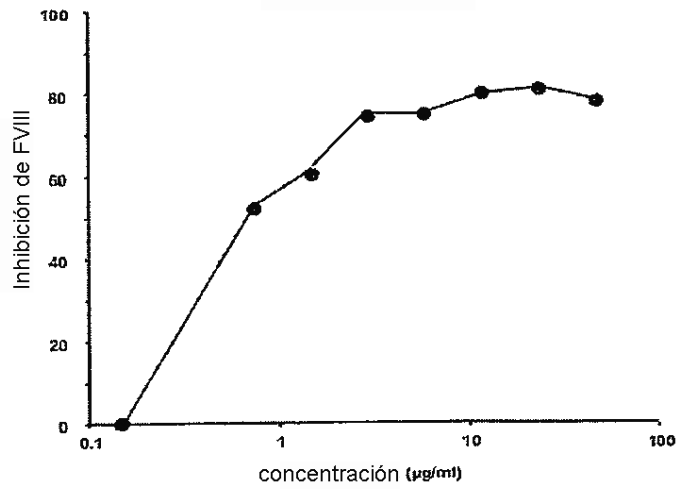


Figura 14

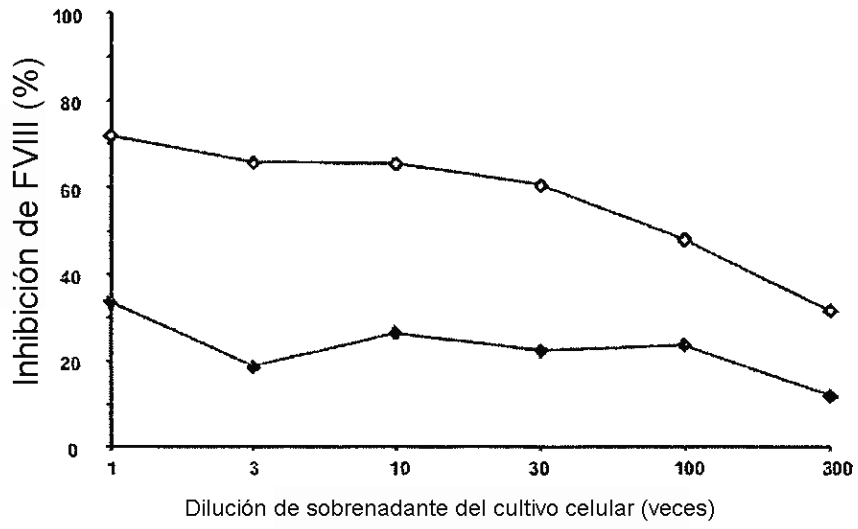


Figura 15

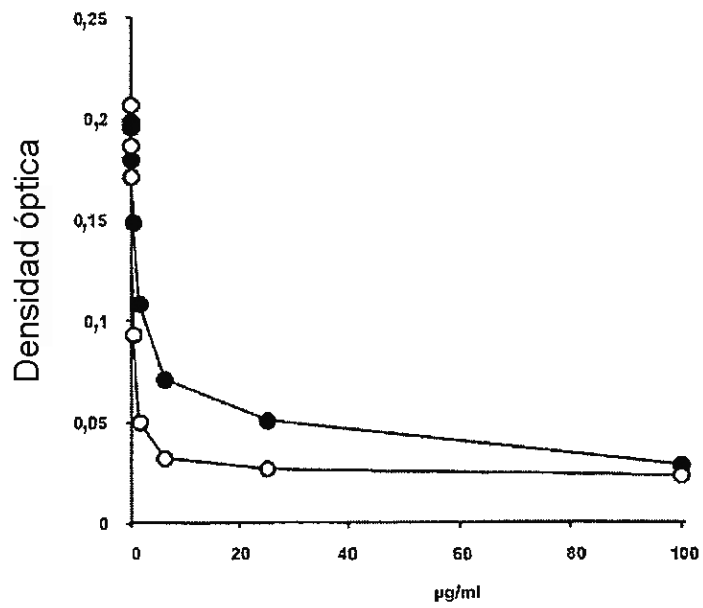


Figura 16

Cadena pesada variable de Krix-1 (SEC ID NO: 1 y 2)

```

1/1                               31/11
ATG GAC TGG ACC TGG AGG ATC CTC TTC TTG GTG GCA GCA GCC ACA GGA GCC CAC TCC CAG
M  D  W  T  W  R  I  L  F  L  V  A  A  A  T  G  A  H  S  Q
<----- Péptido líder ----->

61/21                               91/31
GTG CAA CTG GTG CAA TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTC TCC
V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S  V  K  V  S

121/41                               47           49           151/51
TGC AAG ACC TCT GGA TAC AAC TTC ACC GGC TAC TCT GCT TCT GGA CAT ATC TTC ACC GCC
C  K  T  S  G  Y  N  F  T  G  Y  S  A  S  G  H  I  F  T  A
                *           *
<----- CDR1 ----->

181/61                               211/71
TAC TCT GTG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA AGG ATC
Y  S  V  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  R  I
<----->

241/81                               271/91
AAC CCT AAC AGT GGT GCC ACA GAC TAT GCA CAT AAA TTT CAG GGC AGG GTC ACC ATG TCC
N  P  N  S  G  A  T  D  Y  A  H  K  F  Q  G  R  V  T  M  S
<----- CDR2 ----->

301/101                               331/111
AGG GAC ACG TCC ATC AGC ACA GCC TAC ATG GAA CTG AGC AGG CTG ACA TCT GAC GAC ACG
R  D  T  S  I  S  T  A  Y  M  E  L  S  R  L  T  S  D  D  T

361/121                               391/131
GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GCC GAC AAC TAT TTC GAT ATT GTG ACT GGC TAT ACT TCT
A  M  Y  Y  C  A  R  A  D  N  Y  F  D  I  V  T  G  Y  T  S
<----- CDR3 ----->

421/141                               451/151
CAT TAC TTT GAC TAC TGG GGC CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG
H  Y  F  D  Y  W  G  R  G  T  L  V  T  V  S  S  A  S  T  K
<----->

481/161
GGC CCA TCG GTC TTC C
G  P  S  V  F

```

Figura 17

Cadena ligera variable de Krix-1 (SEC ID NO: 3 y 4)

```

1/1                               31/11
ATG GAA ACC CCA GCT CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA GAT ACC ACC GGA
M E T P A Q L L F L L L L W L P D T T G
<----- lider ----->

61/21                               91/31
GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC
E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T

121/41                               151/51
CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT GCC AGC GCC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAA AAA
L S C R A S Q S V A S A Y L A W Y Q Q K
<----- CDR1 ----->

181/61                               211/71
CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGT AGG GCC ACC GAC ATC CCA
P G Q A P R L L I Y G A S S R A T D I P
<----- CDR2 ----->

241/81                               271/91
CAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG
H R F S G S G S G T D F T L T I S R L E

301/101                               331/111
CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAC TAC TGT CAG CAA TAT GGT ACC TCA GCC TTA CTC ACT TTC
P E D F A V Y Y C Q Q Y G T S A L L T F
<----- CDR3 ----->

361/121                               391/131
GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC
G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F

421/141
CCG CCA TCT
P P S

```

Figura 17 (continuación)

scFvLE2E9VLVH Q(His) (SEC ID 25 y 26)

1/1 31/11
 atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca gat acc acc gga
 M E T P A Q L L F L L L L W L P D T T G
 <----- péptido líder ----->

61/21 91/31
 gaa att gtg ttg acg cag tet cca ggc acc ctg tet ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc
 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T

121/41 151/51
 ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt gcc agc gcc tac tta gcc tgg tac cag caa aaa
 L S C R A S Q S V A S A Y L A W Y Q Q K

181/61 211/71
 cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agt agg gcc acc gac atc cca
 P G Q A P R L L I Y G A S S R A T D I P
 ----- VLJk -----

241/81 271/91
 cac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag
 H R F S G S G S G T D F T L T I S R L E

301/101 331/111
 cct gaa gat ttt gca gtg tac tac tgt cag caa tat ggt acc tca gcc tta ctc act ttc
 P E D F A V Y Y C Q Q Y G T S A L L T F

361/121 391/131
 ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cga ggt gga ggc ggt tca gcc gga ggt ggc tot
 G G G T K V E I K R G G G G S G G G G S
 -----> <----- Linker -----

421/141 451/151
 ggc ggt ggc gga tcg cag gta cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg
 G G G G S Q V Q L V Q S G A E V K K P G
 -----> <-----

481/161 511/171
 gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag acc tct gga tac caa ttc acc ggc tac tct gct tct
 A S V K V S C K T S G Y Q F T G Y S A S

Gln47 Thr49

541/181 571/191
 gga cat atc ttc acc gcc tac tct gtg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt
 G H I F T A Y S V H W V R Q A P G Q G L

Figura 18

ES 2 412 489 T3

```
601/201                                631/211
gag tgg atg gga agg atc aac cct aac agt ggt gcc aca gac tat gca cat aaa ttt cag
E W M G R I N P N S G A T D Y A H K F Q
-----VHDJH-----
```

```
661/221                                691/231
ggc agg gtc acc atg tcc agg gac acg tcc atc agc aca gcc tac atg gaa ctg agc agg
G R V T M S R D T S I S T A Y M E L S R
-----
```

```
721/241                                751/251
ctg aca tct gac gac aca gcc atg tat tac tgt gcg aga gcc gac aac tat ttc gat att
L T S D D T A M Y Y C A R A D N Y F D I
-----
```

```
781/261                                811/271
gtg act ggc tat act tct cat tac ttt gac tac tgg ggc cgg gga acc ctg gtc acc gtc
V T G Y T S H Y F D Y W G R G T L V T V
-----
```

```
841/281
tcc tca cat cat cat cat cat cat tga
S S H H H H H H *
-----> <-----etiqueta His (6) ----->
```

Figura 18 (continuación)

Región Variable de Cadena Pesada de RHD5 (SEC ID NO: 29 y 30)

```

1/1                               31/11
ATG GAC TGG ACC TGG AGG TTC CTC TTT GTG GTG GCA GCA GCT GCA GGT GTC CAG TCC CAG
M D W T W R F L F V V A A A A G V Q S Q

<----- Péptido líder ----->
61/21                               91/31
GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCC GGG TCG TCG GTG ATG GTC TCC
V Q L V Q S G A E V K K P G S S V M V S

121/41                               151/51
TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TTT GGT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCT
C K A S G G T F S S F G I S W V R Q A P
<----- CDR1 ----->

181/61                               211/71
GGA CAA GGG CTT GAG TGG GTG GGA GGG ATC ATC CCT ATC TTT GGT ACA GCA AAC ACC GCA
G Q G L E W V G G I I P I F G T A N T A
<----- CDR2 ----->

241/81                               271/91
CGG AAC TTC CAG AAT AGA GTC ACC ATT ACC GCG GAC GAA TTC ACG AGC ACA GCC TAC ATA
R N F Q N R V T I T A D E F T S T A Y I
----->

301/101                               331/111
CGA CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAA GAT ACG GCC GTG TAT TAC TGT GTC GGC GGT CGA GAT
R L R S L R S E D T A V Y Y C V G G R D
<----->

361/121                               391/131
GCC TAC AGC TTT GAT GGT TTT GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
A Y S F D G F D V W G Q G T M V T V S S
----- CDR3 ----->

421/141
GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC
A S T K G P S V F P
<----- región constante ----->

```

Figura 19

Región Variable de Cadena Ligera de RHD5 (SEC ID NO:31 y 32)

```

1/1                               31/11
ATG GCA TGG ATC CCT CTC TTC CTC GGC GTC CTT GTT TAC TGC ACA GGA TCC GTG GCC TCC
M  A  W  I  P  L  F  L  G  V  L  V  Y  C  T  G  S  V  A  S
<----- Péptido líder ----->

61/21                               91/31
TCT GGG CTG ACT CAG CCA CAC TCA GTG TCC GTG TCC CCA GGA CAG ACA GCC AAC ATC ACC
S  G  L  T  Q  P  H  S  V  S  V  S  P  G  Q  T  A  N  I  T
                                     *      *

121/41                               151/51
TGC TCT AGA GAT AAG TTG GGT CAT AAA TTT GCT TCC TGG TAT CAA CAG AAG CCA GGC CAG
C  S  R  D  K  L  G  H  K  F  A  S  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q
<----- CDR1 ----->

181/61                               211/71
TCC CCT GCT CTT CTC ATC TAT CAA GAC AGC AAG CGG CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGA TTC
S  P  A  L  L  I  Y  Q  D  S  K  R  P  S  G  I  P  E  R  F
<----- CDR2 ----->

241/81                               271/91
TCT GGC TCC AAC TCT GGG AAC ACA GCC ACT CTG ACC ATC AGC GGG ACC CAG GCT ATG GAT
S  G  S  N  S  G  N  T  A  T  L  T  I  S  G  T  Q  A  M  D

301/101                               331/111
GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GCG TGG GAC AAC ACC ACT GCC GTA TTC GGC GGA GGG ACC
E  A  D  Y  Y  C  Q  A  W  D  N  T  T  A  V  F  G  G  G  T
<----- CDR3 ----->
                                     *      *

361/121                               391/131
AAG TTG ACA GTC CTA AGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCG CCC TCC
K  L  T  V  L  S  Q  P  K  A  A  P  S  V  T  L  F  P  P  S
<----- región constante ----->

```

Figura 19 (continuación)