

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 495 092**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/36** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2009 E 09703856 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2245069**

54 Título: **Anticuerpos humanizados específicos para el factor von Willebrand**

30 Prioridad:

**23.01.2008 US 23025 P**

**14.04.2008 US 44787 P**

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

**16.09.2014**

73 Titular/es:

**GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)**

**Chemin de la Combeta, 5**

**2300 La Chaux-de-Fonds, CH**

72 Inventor/es:

**LAZARIDES, ELIAS;**

**WOODS, CATHERINE;**

**FAN, XIAOMIN;**

**HOU, SAMUEL;**

**MOTTL, HARALD;**

**BLEIN, STANISLAS y**

**BERTSCHINGER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 495 092 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 humanizados específicos para el factor von Willebrand

### Campo

- 5 La presente descripción se refiere en general a anticuerpos humanizados o fragmentos de fijación de los mismos específicos para el factor von Willebrand. Más específicamente, la descripción se refiere en general a anticuerpos humanizados o fragmentos de fijación de los mismos específicos para el factor von Willebrand, que incluyen los que comprenden CDRs correspondientes a las CDRs presentes en el anticuerpo murino NMC-4.

### Antecedentes

- 10 La regulación de la adhesión de las plaquetas a sitios de lesión vascular implica una interacción bien orquestada de varias proteínas y juega un papel importante a la vez en la hemostasis y la trombosis. Una proteína de este tipo que contribuye a la adhesión de las plaquetas es el Factor von Willebrand (vWF), una glicoproteína multimérica de gran tamaño presente en el plasma sanguíneo. Se supone que vWF interacciona con el receptor de las plaquetas GPIIb- $\alpha$  a través de su dominio A1 promoviendo con ello el enrollamiento y la adhesión de las plaquetas (Moake *et al.* (1986) J. Clin. Invest. 78: 1456-61). Subsiguientemente al enrollamiento y la adhesión de las plaquetas, puede formarse un tapón plaquetas/fibrina que da como resultado la cesación de la hemorragia. Sin embargo, una respuesta excesiva de las plaquetas y/o de la coagulación puede conducir a condiciones trombóticas patológicas. Variantes de moléculas de fijación anti-vWF se describen en WO 2006/046935 que comprenden regiones variables heterómeras optimizadas por injerto de CDR.

- 20 Dado que las terapias actuales dirigidas hacia la inhibición de la activación plaquetaria (*v.g.*, GPIIb/IIIa, el receptor ADP, antagonistas de ciclooxigenasa o fosfodiesterasa) o la coagulación (*v.g.*, inhibidores de trombina y factor Xa) están asociadas con complicaciones hemorrágicas, existe necesidad de desarrollar agentes que sean capaces de inhibir sustancialmente la trombosis sin deteriorar significativamente la hemostasis.

### Sumario

- 25 La presente descripción se refiere en general a anticuerpos humanizados o fragmentos de fijación de los mismos específicos para el factor von Willebrand (vWF) humano, métodos para su preparación y uso, que incluyen métodos para tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por vWF. Los anticuerpos humanizados o fragmentos de fijación de los mismos específicos para vWF humano pueden comprender regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo no humano (*v.g.*, CDRs murinas) y regiones marco humanas.

- 30 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 28.

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 237 y una secuencia de cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 238.

- 35 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende (a) regiones determinantes de la complementariedad de cadenas pesada y ligera (CDRs) correspondientes a las CDRs presentes en las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo murino NMC-4 (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente; y (b) una región marco de cadena pesada correspondiente a la región marco presente en la región variable de anticuerpos humanos derivados de VH 4-59, tales como el anticuerpo AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) y/o una región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco presente en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (VL 018) (SEQ ID NO: 6).

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO: 9).

- 45 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender además una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).

- 50 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena ligera siguientes: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12).

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende las CDRs de cadena ligera siguientes: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2:

YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender además una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).

5 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: CDRs de cadena pesada, HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO: 9); y CDRs de cadena ligera, LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender además una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6) y/o una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).

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

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado específico para vWF que comprende una o más de las regiones variables de cadena ligera siguientes: L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30).

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

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

40 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO: 9); y una o más de las CDRs de cadena ligera siguientes: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender adicionalmente una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6) y/o una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).

45 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación como se describe en esta memoria, que se fija a vWF con una afinidad (Kd) de 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 1 nM o menos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 0,4 nM. La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación como se describe en esta memoria que compite para la fijación a vWF con una afinidad (Ki) de 100 nM o menos, preferiblemente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM.

55 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo que se fija al dominio A1 de vWF con una afinidad (Kd) de 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 1 nM o menos, de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 0,4 nM. La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo que compite respecto a la fijación al dominio A1 de vWF con una afinidad (Ki) de 100 nM o menos, preferiblemente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM.

La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que 65°C.

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1 (GFSLTDYGVD; SEQ ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEQ ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNYDYALDY; SEQ ID NO: 9) y una cadena ligera CDR1, una cadena ligera CDR2 y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEQ ID NO: 12), con la salvedad de que al menos una de LCDR1 y/o LCDR2 no es SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10) o YTSSLHS (SEQ ID NO: 11), respectivamente.

La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende, HCDR1 (GFSLTDYGVD; SEQ ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEQ ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNYDYALDY; SEQ ID NO: 9), LCDR1 (SASQDINKYLN; SEQ ID NO: 10), LCDR2 (YTSSLHS; SEQ ID NO: 11) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEQ ID NO: 12); las regiones marco de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 en la familia VH4 de la línea germinal de anticuerpos humanos; y regiones marco de cadena ligera 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 en la familia VK1 de la línea germinal de anticuerpos humanos.

La presente descripción se refiere también en general a ácidos nucleicos aislados que codifican los presentes anticuerpos humanizados descritos en esta memoria específicos para vWF humano. En algunas realizaciones, un vector puede comprender los ácidos nucleicos descritos en esta memoria. En otra realización, una célula hospedadora puede comprender los ácidos nucleicos descritos.

La presente descripción se refiere también en general a métodos de producción de un anticuerpo humanizado específico para vWF que comprenden cultivar la célula hospedadora de la presente descripción de tal modo que el ácido nucleico se exprese y el anticuerpo se produzca. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, el anticuerpo se recupera del medio de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, antes del cultivo, la célula hospedadora se co-transfecta con un vector que comprende ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y con un vector que comprende ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera.

La presente descripción se refiere en general a composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado específico para vWF y un portador farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona también composiciones que comprenden un primer anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria y un segundo anticuerpo que se fija al dominio A1 de vWF. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo es AJW-200.

La presente descripción se refiere también en general a métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombótico) en un individuo (v.g., un paciente) por administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF. En algunas realizaciones, el individuo es un humano. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para inhibir la agregación de las plaquetas pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de hemorragia.

La presente descripción proporciona también usos de anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria como medicamento. La presente descripción proporciona también usos de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para inhibir la agregación plaquetaria, pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de hemorragia.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno mediado por vWF es una enfermedad o trastorno trombótico. En algunas realizaciones, el trastorno trombótico es enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular tal como ataque isquémico. En algunas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con diabetes. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno trombótico es inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad de células falciformes, rechazo de xenoinjertos, enfermedad vascular periférica, purpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes. En algunas realizaciones, la enfermedad cerebrovascular es demencia vascular, ataque isquémico, o prevención de ataques recurrentes.

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

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

En algunas realizaciones, el fragmento de fijación de anticuerpo específico para vWF es un Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub> o un diacuerpo.

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

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

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

#### 15 Breve descripción de las figuras

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

- 20 La Figura 2A-B muestra la competición para la fijación de NMC-4 marcado con Eu por un anticuerpo quimérico NMC-4 sin marcar (competición homóloga) y AJW200, solos y en combinación (Figura 2A). La competición de un anticuerpo quimérico NMC4 marcado con Eu por el anticuerpo monoclonal NMC-4 sin marcar IgG de control isotipo AJW200 y un derivado humanizado del anticuerpo NMC4 con regiones variables designadas como H9, L9 (Figura 2A). Gráfica de Hill de competición de NMC-4 en presencia o ausencia de AJW200 20 nM (Figura 2B).

- 25 La Figura 3 A-E muestra la capacidad de NMC-4 para bloquear la adhesión plaquetaria al vWF endotelial en condiciones de flujo de cizalladura, con inclusión de fotomicrografías de plaquetas adherentes a células HUVEC. Se trataron monocapas de células HUVEC con PBS (Figura A) o histamina 25  $\mu$ M (Figuras B-E), más 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-vWF, NMC-4 (Figura C), 18  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$ , AK2 (Figura D), o 18  $\mu$ g/ml de IgG de ratón (Figura E). Los diferentes anticuerpos se incluían también en las suspensiones de plaquetas correspondientes inmediatamente antes de la perfusión a través de las monocapas.

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

La Figura 5 muestra el efecto de dosis crecientes (0,03-10 mg/kg) de GBR600 sobre las reducciones cíclicas de flujo (CFRs) en los babuinos.

- 35 La Figura 6 muestra el efecto de dosis crecientes (0,01-10 mg/kg) de GBR600 sobre las CFRs en los babuinos.

La Figura 7 muestra el efecto de dosis acumuladas (0,005-0,07 mg/kg) de GBR600 sobre las CFRs en los babuinos.

La Figura 8 muestra la curva de respuesta a la dosis de dosis acumuladas de GBR600 sobre las CFRs en los babuinos.

La Figura 9 muestra el efecto de dosis crecientes (1-10 mg/kg) de clopidogrel en los babuinos.

- 40 La Figura 10 muestra una comparación del efecto de infusión de dosis crecientes de GBR600 y clopidogrel en el test de hemorragia por incisión. Las dosis se han expresado como múltiplos de la dosis eficaz (v.g., la dosis acumulada, a la cual las CFRs se reducen a cero).

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

#### 45 Descripción detallada

La presente descripción proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de fijación de los mismos específicos para el factor von Willebrand (vWF) humano, que incluyen aquéllos que comprenden regiones CDR correspondientes a una o más las CDRs o porciones de las CDRs presentes en el anticuerpo murino NMC-4. El anticuerpo NMC-4 se fija al sitio de fijación en GP1b- $\alpha$  en el dominio A1 de vWF (véase, v.g., Fujimura *et al*/ Blood, 77: 113-20, 1999, Shima *et al*, J Nara Med Assoc. 36:162, 1985). Los anticuerpos humanizados de la presente descripción pueden comprender adicionalmente regiones marco humanas modificadas o no modificadas, tales como una región marco de cadena pesada correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano

- AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) y una región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6). Una gran diversidad de regiones marco humanas, con inclusión de aquéllas que han demostrado alta homología con las subfamilias a las que pertenecían las regiones de cadena pesada y ligera de NMC-4 murino, se han considerado como moléculasceptoras potenciales para las CDRs de NMC-4. Muy sorprendentemente, el injerto de CDRs de NMC-4 en uno de los marcos humanos de región variable de cadena pesada seleccionados y uno de los marcos humanos de región variable de cadena ligera seleccionados sin cambios adicionales (*v.g.*, residuos marco mutantes humanos a residuos murinos), es suficiente para retener la potencia del anticuerpo humanizado en el bloqueo de las respuestas a las plaquetas mediadas por vWF.
- 10 El término “anticuerpo quimérico” incluye anticuerpos en los cuales las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tales como un anticuerpo en el cual las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo murino y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.
- 15 El término “anticuerpo humanizado” incluye anticuerpos en los cuales secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Modificaciones de la región marco adicionales pueden hacerse dentro de las secuencias marco humanas así como dentro de las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero.
- 20 El término “anticuerpo humano” incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones marco como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (*v.g.*, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatoria o específica del sitio o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se utiliza en esta memoria, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.
- 25 Como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que se “deriva de” una secuencia de la línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunización de un ratón transgénico que es portador de genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentada en fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que se “deriva de” una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal por comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y selección de la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que está más próxima en secuencia (es decir, % de identidad máximo) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que se “deriva de” una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas existentes naturalmente o a introducción intencionada de mutación orientada. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado o fragmento del mismo tiene típicamente una identidad de 80% como mínimo en secuencia de aminoácidos respecto a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican como humano el anticuerpo humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (*v.g.*, secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 90%, o incluso al menos 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal que incluye, por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y 100%.
- 30 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo (*v.g.*, Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub>, un diacuerpo o un anticuerpo monocatenario) específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28. La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF, que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237 y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.
- 35 50 55 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO: 9); y una o más de las CDRs de cadena ligera siguientes: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12).

La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGVGD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9); o una o más de las CDRs de cadena ligera siguientes: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12).

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: CDRs de cadena pesada, HCDR1: GFSLTDYGVGD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9); y cadena ligera CDRs, LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12).

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: CDRs de cadena pesada, HCDR1: GFSLTDYGVGD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9); o cadena ligera CDRs, LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12).

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

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

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

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

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

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGVGD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9).

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGVGD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGVGD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4), en donde la región marco de cadena pesada no comprende uno o más residuos murinos.

- 5 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las CDRs de cadena pesada siguientes: HCDR1: GFSLTDYGV D (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGN YDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4), en donde la región marco de cadena pesada comprende adicionalmente uno o más residuos murinos.
- 10 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTDYGV D (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGN YDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).
- 15 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTDYGV D (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGN YDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4), en donde la región marco de cadena pesada no comprende uno o más residuos murinos.
- 20 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTDYGV D (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGN YDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4), en donde la región marco de cadena pesada comprende además uno o más residuos murinos.
- 25 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmentos de fijación del mismo específicos para vWF que comprenden una o más de las CDRs de cadena ligera siguientes: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12).
- 30 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmentos de fijación del mismo específicos para vWF que comprenden una o más de las CDRs de cadena ligera siguientes: CDRs: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12) y una región marco de cadena ligera del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6), en donde la región marco de cadena ligera no comprende uno o más residuos murinos.
- 35 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmentos de fijación del mismo específicos para vWF que comprenden una o más de las CDRs de cadena ligera siguientes: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12) y una región marco de cadena ligera del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6), en donde la región marco de cadena ligera comprende adicionalmente uno o más residuos murinos.
- 40 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende, las CDRs de cadena ligera LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12).
- 45 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende, las CDRs de cadena ligera LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12), y una región marco de cadena ligera del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).
- 50 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende las CDRs de cadena ligera: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12), y una región marco de cadena ligera del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6), en donde la región marco de cadena ligera no comprende uno o más residuos murinos.
- 55 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende las CDRs de cadena ligera: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12) y una región marco de cadena ligera del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6), en donde la región marco de cadena ligera comprende adicionalmente uno o más residuos murinos.

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende las CDRs de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVGD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO: 9); cadena ligera CDRs: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12); y opcionalmente una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6) y/o una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).

La presente descripción proporciona también variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo específicas para vWF. Usualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF tendrán una secuencia de aminoácidos de la región marco de cadena pesada y/o ligera, que es idéntica al menos en un 80% (teniendo al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos) a la secuencia de aminoácidos de la región marco de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo humanizado original de la cadena pesada o la cadena ligera, v.g., de las secuencias de la región variable pesada y/o ligera como en SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 28, respectivamente. De manera preferible, la identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región marco de cadena pesada y/o ligera es al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, y muy preferiblemente al menos 95%, en particular 96%, más particularmente 97%, de modo aún más particular 98%, y muy particularmente 99%, incluyendo por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y 100%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en esta memoria como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidato que son idénticos al anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para residuos vWF, después de alineación de las secuencias e introducción de lagunas, en caso necesario, para alcanzar la identidad porcentual máxima de secuencia. Así, la identidad de secuencia puede determinarse por métodos estándar que se utilizan comúnmente para comparar la semejanza en posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. La utilización de un programa de computadora tal como BLAST o FASTA, dos polipéptidos se alinean para coincidencia óptima de sus aminoácidos respectivos (sea a lo largo de la longitud total de una o ambas secuencias o a lo largo de una porción predeterminada de una o más secuencias). Los programas proporcionan una penalidad de apertura por defecto y una penalidad de laguna por defecto, y puede utilizarse una matriz de registro tal como PAM250 (una matriz de registro estándar; véase Dayhoff *et al.*, en Atlas of Protein Secuencia and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978), en conjunción con el programa de computadora. Por ejemplo, la identidad porcentual puede calcularse como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100 y dividido luego por la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro del intervalo de coincidencias y el número de lagunas introducidas en las secuencias más largas a fin de alinear las dos secuencias.

Así pues, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una región marco que es idéntica al menos en un 80% a la región marco de SEQ ID NO: 19 y/o una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una región marco que es idéntica al menos en un 80% a la región marco de SEQ ID NO: 28. La presente descripción proporciona además un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una región marco que es idéntica al menos en un 80% a la región marco de SEQ ID NO: 237 y/o una secuencia de la región variable de cadena ligera que comprende una región marco que es idéntica al menos en un 80% a la región marco de SEQ ID NO: 238.

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

La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una o más de las regiones variables de cadena pesada siguientes: H2 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 17), H8 (SEQ ID NO: 18), H9 (SEQ ID NO: 19), H12 (SEQ ID NO: 20), H13 (SEQ ID NO: 21), H14 (SEQ ID NO: 22), H15 (SEQ ID NO: 145) o H16 (SEQ ID NO: 146) (los polinucleótidos que codifican las regiones variables de cadena pesada arriba mencionadas se proporcionan por SEQ ID NOs: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139, respectivamente).

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena ligera siguientes: L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID

NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30) (los polinucleótidos que codifican las regiones variables de cadena ligera arriba mencionadas son proporcionadas por SEQ ID NO: 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 y 127, respectivamente).

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

10 La presente descripción proporciona anticuerpos humanizados o fragmentos de fijación de los mismos específicos para vWF que comprenden L5 (SEQ ID NO: 23) y H2 (SEQ ID NO: 13); L5 (SEQ ID NO: 23) y H4 (SEQ ID NO: 14); L5 (SEQ ID NO: 23) y H5 (SEQ ID NO: 15); L5 (SEQ ID NO: 23) y H6 (SEQ ID NO: 16); L5 (SEQ ID NO: 23) y H7 (SEQ ID NO: 17); L5 (SEQ ID NO: 23) y H8 (SEQ ID NO: 18); L4 (SEQ ID NO: 24) y H2 (SEQ ID NO: 13); L6 (SEQ ID NO: 25) y H2 (SEQ ID NO: 13); L11 (SEQ ID NO: 30) y H2 (SEQ ID NO: 13); L7 (SEQ ID NO: 26) y H2 (SEQ ID NO: 13); L9 (SEQ ID NO: 28) y H9 (SEQ ID NO: 19); L8 (SEQ ID NO: 27) y H9 (SEQ ID NO: 19); L7 (SEQ ID NO: 26) y H9 (SEQ ID NO: 19); L6 (SEQ ID NO: 25) y H9 (SEQ ID NO: 19); L4 (SEQ ID NO: 24) y H9 (SEQ ID NO: 19); L5 (SEQ ID NO: 23) y H9 (SEQ ID NO: 19); L10 (SEQ ID NO: 29) y H9 (SEQ ID NO: 19); L9 (SEQ ID NO: 28) y H9 (SEQ ID NO: 19); L9 (SEQ ID NO: 28) y H12 (SEQ ID NO: 20); L9 (SEQ ID NO: 28) y H13 (SEQ ID NO: 21); L9 (SEQ ID NO: 28) y H14 (SEQ ID NO: 22); L11 (SEQ ID NO: 30) y H9 (SEQ ID NO: 19); o L11 (SEQ ID NO: 30) y H14 (SEQ ID NO: 22).

15 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria, que se fija a vWF con una afinidad ( $K_d$ ) de 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 1 nM o menos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 nM (v.g., desde aproximadamente 0,21, 0,28 ó 0,34 a aproximadamente 0,25, 0,32 ó 0,38 nM). La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación como se describe en esta memoria, que compite en cuanto a fijación a vWF con una afinidad ( $K_i$ ) de 100 nM o menos, preferiblemente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM (v.g., 0,22, 0,28 ó 0,34 a aproximadamente 2,3, 3,5 ó 4,7 nM).

20 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria, que se fija al dominio A1 de vWF con una afinidad ( $K_d$ ) de 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 1 nM o menos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 nM (v.g., desde aproximadamente 0,21, 0,28 ó 0,34 a aproximadamente 0,25, 0,32 ó 0,38 nM). La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo que compite respecto a la fijación al dominio A1 de vWF con una afinidad ( $K_i$ ) de 100 nM o menos, preferiblemente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM (v.g., 0,22, 0,28 ó 0,34 a aproximadamente 2,3, 3,5 ó 4,7 nM).

25 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que 65°C, preferiblemente mayor que 70°C, más preferiblemente mayor que 75°C, y muy preferiblemente mayor que 80°C. Para análisis de la estabilidad térmica del fragmento FAB se utilizan medidas por calorimetría de barrido diferencial, en donde se identifica una temperatura de fusión de punto medio del fragmento FAB en el contexto de una IgG de longitud total. Esta clase de medidas calorimétricas son conocidas por las personas expertas y pueden llevarse a cabo conforme a, v.g. Garber y Demarest (2007) BBRC 355:751-7. Sorprendentemente, se ha encontrado que el anticuerpo humanizado de la presente invención tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que el anticuerpo no humanizado paterno. El anticuerpo humanizado paterno es usualmente un anticuerpo murino, en particular un anticuerpo murino NMC-4. Así, la presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que el anticuerpo paterno no humanizado.

30 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende las secuencias de aminoácidos de la región hipervariable siguientes: HCDR1 (GFSLTDYGVD; SEQ ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEQ ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNIDYALDY; SEQ ID NO: 9) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEQ ID NO: 12), con la salvedad de que al menos una de LCDR1 y/o LCDR2 no es SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10) o YTSSLHS (SEQ ID NO: 11), respectivamente. Sorprendentemente, los anticuerpos NMC-4 humanizados que carecen de LCDR1 y/o LCDR2 de NMC-4 retienen afinidad de fijación nanomolar para vWF.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender además regiones marco de cadena pesada de anticuerpos humanos. En algunas realizaciones, las regiones marco de cadena pesada corresponden a regiones marco de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59. En algunas realizaciones, las

regiones marco de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59 comprenden además uno o más residuos murinos. En algunas realizaciones, las regiones marco de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59 no comprenden uno o más residuos murinos.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender adicionalmente regiones marco de cadena ligera de anticuerpo humano. En algunas realizaciones, las regiones marco de cadena ligera corresponden a las regiones marco de cadena ligera presentes en un anticuerpo humano derivado de 018. En algunas realizaciones, las regiones marco de cadena ligera presentes en un anticuerpo humano derivado de 018 comprenden además uno o más residuos murinos. En algunas realizaciones, las regiones marco de cadena ligera presentes en un anticuerpo humano derivado de 018 no comprenden uno o más residuos murinos.

10 Lcdr1 y/o Lcdr2 pueden obtenerse a partir de una fuente humana. En algunas realizaciones, Lcdr1 y/o Lcdr2 pueden obtenerse a partir del mismo anticuerpo (v.g., un solo anticuerpo humano). En otras realizaciones, el CDR1 y/o el CDR2 pueden obtenerse a partir de anticuerpos diferentes (v.g., dos anticuerpos humanos). Si el CDR2 se obtiene de una fuente humana, ésta es preferiblemente DASNLET (SEQ ID NO: 118).

15 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: Hcdr1 (GFSLTDYGV D; SEQ ID NO: 7), Hcdr2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEQ ID NO: 8), Hcdr3 (DPADYGN DYALDY; SEQ ID NO: 9), Lcdr1 (SASQDINKYLN; SEQ ID NO: 10), Lcdr2 (YTSSLHS; SEQ ID NO: 11) y Lcdr3 (QQYEKLPWT; SEQ ID NO: 12); las regiones marco de cadena pesada 1,2 y 3 correspondientes a las regiones marco presentes en la secuencia 4-59 de la línea germinal de cadena pesada de anticuerpo humano, en donde la región marco 1 de cadena pesada es QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO: 171); la región marco de cadena pesada 2 es WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 172); y la región marco de cadena pesada 3 es RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 173); y la región marco de cadena ligera 1, 2 y 3 correspondiente a regiones marco presentes en la secuencia 018 de la línea germinal de cadena ligera de anticuerpo humano, en donde la región marco 1 de cadena ligera es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 186); la región marco de cadena ligera 2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 187); y la región marco de cadena ligera 3 es GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYC (SEQ ID NO: 188).

20 La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: Hcdr1 (GFSLTDYGV D; SEQ ID NO: 7), Hcdr2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEQ ID NO: 8), Hcdr3 (DPADYGN DYALDY; SEQ ID NO: 9)), Lcdr1 (SASQDINKYLN; SEQ ID NO: 10), Lcdr2 (YTSSLHS; SEQ ID NO: 11) y Lcdr3 (QQYEKLPWT; SEQ ID NO: 12); y la región marco de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondiente a regiones marco presentes en la secuencia 4-34 de la línea germinal de la cadena pesada de anticuerpo humano, en donde la región marco 1 de cadena pesada es QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY (SEQ ID NO:165); la región marco de cadena pesada 2 es WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 166) y la región marco de cadena pesada 3 es RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 167); y la región marco de cadena ligera 1, 2 y 3 correspondiente a regiones marco presentes en la secuencia 018 de la línea germinal de la cadena ligera del anticuerpo humano, en donde la región marco 1 de cadena ligera es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 186); la región marco de cadena ligera 2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 187); y la región marco de cadena ligera 3 es GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYC (SEQ ID NO: 188).

30 La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para el dominio A1 en vWF que comprende, Hcdr1 (GFSLTDYGV D; SEQ ID NO: 7), Hcdr2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEQ ID NO: 8), Hcdr3 (DPADYGN DYALDY; SEQ ID NO: 9), Lcdr1 (SASQDINKYLN; SEQ ID NO: 10), Lcdr2 (YTSSLHS; SEQ ID NO: 11) y Lcdr3 (QQYEKLPWT; SEQ ID NO: 12); regiones marco 1, 2 y 3 de cadena pesada correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en un anticuerpo de la familia VH4 de la línea germinal de anticuerpos humanos; y regiones marco de cadena ligera 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en un anticuerpo de la familia VK1 de la línea germinal de anticuerpos humanos.

40 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 4-04 de la línea germinal variable de cadena pesada (v.g., FW1: QVQLQESGPGLVKPSGTLSTLCAVS (SEQ ID NO: 147), FW2: WVRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 148) y FW3: RVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 149).

50 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 4-28 de la línea germinal variable de cadena pesada (v.g., FW1: QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVS (SEQ ID NO: 150), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 151) y FW3: RVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 152).

55 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender las regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 4-30.1 de la secuencia de la línea germinal variable de cadena pesada (v.g., FW1: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVS (SEQ ID NO: 153), FW2: WIRQHPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 154) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 155).

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

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

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

- 15 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 4-34 de la línea germinal variable de cadena pesada (v.g., FW1: QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY (SEQ ID NO: 165), FW2: VIIIHQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 166) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 167).

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

El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 4-59 de la línea germinal variable de cadena pesada (v.g., FW1: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS (SEQ ID NO: 171), v.g., FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 172) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 173).

- 25 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 4-61 de la línea germinal variable de cadena pesada (v.g., FW1: QLQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS (SEQ ID NO: 174), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 175) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 176).

- 30 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 4-b de la línea germinal variable de cadena pesada (v.g., FW1: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVS (SEQ ID NO: 177), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 178) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 179).

- 35 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 012 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 180), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 181) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 182).

- 40 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 02 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 183), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 184) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 185).

El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 018 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 186), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 187) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 188).

- 45 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia 08 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 189), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 190) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 191).

- 50 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia A20 de la línea germinal de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 192), FW2: WYQQKPGKVPKLLIY (SEQ ID NO: 193) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 194).

El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia A30 de la línea germinal variable de cadena kappa

(v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 195), FW2: WYQQKPGKAPKRLIY (SEQ ID NO: 196) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 197).

5 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L1 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 198), FW2: WFQQKPGKVPKHLIY (SEQ ID NO: 199) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 200).

10 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L14 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 201), FW2: WFQQKPGKAPKSLIY (SEQ ID NO: 202) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 203).

El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L15 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 204), FW2: WYQQKPEKAPKSLIY (SEQ ID NO: 205) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 206).

15 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L4 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 207), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 208) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 209).

20 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L18 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 210), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 211) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 212).

25 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L5 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 213), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 214) nd FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 215).

30 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L19 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 216), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 217) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 218).

El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L8 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 219), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 220) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 221).

35 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L23 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 222), FW2: WYQQKPAKAPKLFYIY (SEQ ID NO: 223) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 224).

40 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L9 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITC (SEQ ID NO: 225), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 226) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC (SEQ ID NO: 227).

45 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L24 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISC (SEQ ID NO: 228), FW2: WYQQKPGKAPPELLIY (SEQ ID NO: 229) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC (SEQ ID NO: 230).

50 El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L11 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 231), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 232) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 233).

El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede comprender regiones marco 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en la secuencia L12 de la línea germinal variable de cadena kappa (v.g., FW1: DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 234), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 235) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYC (SEQ ID NO: 236).

La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para el dominio A1 en vWF que comprende: HCDR1 (GFSLTDYGVD; SEQ ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEQ ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNVDYALDY; SEQ ID NO: 9), LCDR1 (SASQDINKYLN; SEQ ID NO: 10), LCDR2 (YTSSLHS; SEQ ID NO: 11) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEQ ID NO: 12); regiones marco de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en el anticuerpo humano 4-04 (SEQ ID NO: 147, 148 y 149, respectivamente), 4-28 (SEQ ID NO: 150, 151 y 152, respectivamente), 4-30.1 (SEQ ID NO: 153, 154 y 155, respectivamente), 4-30.2 (SEQ ID NO: 156, 157 y 158, respectivamente), 4-30.4 (SEQ ID NO: 159, 160 y 161, respectivamente), 4-31 (SEQ ID NO: 162, 163 y 164, respectivamente), 4-34 (SEQ ID NO: 165, 166 y 167, respectivamente), 4-39 (SEQ ID NO: 168, 169 y 170, respectivamente), 4-59 (SEQ ID NO: 171, 172 y 173, respectivamente), 4-61 (SEQ ID NO: 174, 175 y 176, respectivamente) o 4-b (SEQ ID NO: 177, 178 y 179, respectivamente); y regiones marco de cadena ligera 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones marco 1, 2 y 3 presentes en el anticuerpo humano 012 (SEQ ID NO: 180, 181 y 182, respectivamente), 02 (SEQ ID NO: 183, 184 y 185, respectivamente), 018 (SEQ ID NO: 186, 187 y 188, respectivamente), 08 (SEQ ID NO: 189, 190 y 191, respectivamente), A20 (SEQ ID NO: 192, 193 y 194, respectivamente), A30 (SEQ ID NO: 195, 196 y 197, respectivamente), L14 (SEQ ID NO: 198, 199 y 200, respectivamente), L1 (SEQ ID NO: 201, 202 y 203, respectivamente), L15 (SEQ ID NO: 204, 205 y 206, respectivamente), L4 (SEQ ID NO: 207, 208 y 209, respectivamente), L18 (SEQ ID NO: 210, 211 y 212, respectivamente), L5 (SEQ ID NO: 213, 214 y 215, respectivamente), L19 (SEQ ID NO: 216, 217 y 218, respectivamente), L8 (SEQ ID NO: 219, 220, y 221, respectivamente), L23 (SEQ ID NO: 222, 223 y 224, respectivamente), L9 (SEQ ID NO: 225, 226 y 227, respectivamente), L24 (SEQ ID NO: 228, 229 y 230, respectivamente), L11 (SEQ ID NO: 231, 232 y 233, respectivamente) o L12 (SEQ ID NO: 234, 235 y 236, respectivamente).

La presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria que retiene la misma actividad que el anticuerpo no humanizado paterno o como un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables del anticuerpo no humanizado paterno y una región Fc humana. El anticuerpo no humanizado paterno es usualmente un anticuerpo murino, en particular un anticuerpo murino NMC-4. El anticuerpo quimérico que comprende regiones variables del progenitor no humanizado es usualmente un anticuerpo que comprende regiones variables de un anticuerpo murino, en particular de un anticuerpo murino NMC-4 y una región Fc humana. Como región Fc humana se utilizan preferiblemente las regiones Fc humanas que se describen en la presente solicitud.

La actividad del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria, del anticuerpo no humanizado paterno y del anticuerpo quimérico puede medirse como actividad de aglutinación de las plaquetas inducida por ristocetina por determinación de la actividad CE<sub>50</sub> como se describe en el Ejemplo 1. Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria puede considerarse que retiene la misma actividad del anticuerpo paterno no humanizado o del anticuerpo quimérico cuando la actividad CE<sub>50</sub> del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo como se describe en esta memoria es idéntica a la actividad CE<sub>50</sub> o es diferente (v.g., mayor o menor) de la actividad CE<sub>50</sub> del anticuerpo no humanizado paterno o del anticuerpo quimérico.

En una realización preferida de la presente descripción, el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria comprende adicionalmente una región marco de cadena pesada de un anticuerpo humano, en donde la región marco de cadena pesada humana no comprende uno o más residuos murinos.

En una realización preferida adicional de la presente descripción, el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria comprende adicionalmente una región marco de cadena ligera de un anticuerpo humano, en donde la región marco de cadena ligera humana no comprende uno o más residuos murinos.

Una "región marco de cadena pesada humana que no comprende uno o más residuos murinos" o "una región marco de cadena ligera humana que no comprende uno o más residuos murinos" se refiere a una región marco de cadena pesada o ligera humana que no comprende uno o más residuos murinos que existen únicamente en los murinos, v.g. no comprende retromutaciones a residuos que existen únicamente en murinos y que no existen en humanos. Regiones marco de cadena pesada o ligera humana que contienen residuos humanos que existen también en murinos no están excluidas por esta definición. Asimismo, una región marco de cadena pesada o ligera humana de la cual un residuo se ha mutado a un residuo humano común, v.g. a un residuo común a la mayoría de las regiones marco humanas pero que existe también en murinos no está excluida por esta definición.

En el caso de las realizaciones de la presente descripción en las que regiones marco de cadena ligera o pesada de anticuerpos humanos comprenden adicionalmente uno o más residuos murinos, las mismas comprenden usualmente 10 o menos, preferiblemente 9 o menos, más preferiblemente 8 o menos, aún más preferiblemente 7 o menos, muy preferiblemente 6 o menos, en particular 5 o menos, de modo más particular 4 o menos, aún más particularmente 3 o menos, muy particularmente 2 o menos, y del modo más particularmente preferido 1 solo residuo murino.

La presente descripción proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28.

La presente descripción proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237 y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.

- 5 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende regiones CDR correspondientes a las CDRs presentes en el anticuerpo murino NMC-4, una región marco de cadena pesada correspondiente a la región marco presente en la región variable del anticuerpo humano AAC8165.1 (SEQ ID NO: 4) y una región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco presente en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).
- 10 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF humano que comprende: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4). Una secuencia de nucleótidos de una región marco de cadena pesada humana ilustrativa se indica en SEQ ID NO: 116.
- 15 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende las CDRs de cadena ligera LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12) y una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6). Una secuencia de nucleótidos de una región marco de cadena ligera humana ilustrativa se indica en SEQ ID NO: 117.
- 20 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena pesada siguientes: H2 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 17), H8 (SEQ ID NO: 18), H9 (SEQ ID NO: 19), H12 (SEQ ID NO: 20), H13 (SEQ ID NO: 21), H14 (SEQ ID NO: 22), H15 (SEQ ID NO: 145) o H16 (SEQ ID NO: 146).
- 25 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena ligera siguientes: L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30).
- 30 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena pesada siguientes: H2 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 17), H8 (SEQ ID NO: 18), H9 (SEQ ID NO: 19), H12 (SEQ ID NO: 20), H13 (SEQ ID NO: 21), H14 (SEQ ID NO: 22), H15 (SEQ ID NO: 145) o H16 (SEQ ID NO: 146) y una de las regiones variables de cadena ligera siguientes: L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30).
- 35 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de cadena ligera del vector GS264 tal como fue depositada en un microorganismo con DSMZ en fecha 23 de enero de 2008, que tiene el No. de acceso DSM 21059.
- 40 La presente descripción proporciona también un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de cadena pesada del vector GS265 como fue depositada en un microorganismo con DSMZ en fecha 23 de enero de 2008, que tiene el No. de acceso DSM21060.
- Así pues, la presente descripción proporciona también un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF codificado por la secuencia de ácido nucleico codificante de cadena ligera del vector GS264 y por la secuencia de ácido nucleico codificante de cadena pesada del vector GS265.
- 45 La presente descripción proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28.
- 50 La presente descripción proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237 y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.
- 55 La presente descripción proporciona también un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF humano que comprende regiones CDR correspondientes a las CDRs presentes en el anticuerpo murino NMC-4, una región marco de cadena pesada correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAC18165-1 (SEQ ID NO: 4) y una

región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).

5 La presente descripción proporciona también un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo específico para vWF humano que comprende: HCDR1: GFSLTDYGV (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO 4).

10 La presente descripción proporciona también un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF humano que comprende: las CDRs de cadena ligera LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12) y una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).

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

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

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

30 La presente descripción proporciona también un vector que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena ligera del vector GS264 como está depositado en un microorganismo con DSMZ en fecha 23 de enero de 2008, que tiene el número de acceso DSM 21059.

La presente descripción proporciona también un vector que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena pesada del vector GS265 como está depositado en un microorganismo con DSMZ en fecha 23 de enero de 2008, que tiene el número de acceso NO DSM 21060.

35 La presente descripción proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28.

40 La presente descripción proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237 y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.

45 La presente descripción proporciona también una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende regiones CDR correspondientes a las CDRs presentes en el anticuerpo murino NMC-4, una región marco de cadena pesada que corresponde a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) y una región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).

50 La presente descripción proporciona también una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1: GFSLTDYGV (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).

55 La presente descripción proporciona también una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF humano que comprende: cadena ligera CDRs LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3:

QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12) y una la región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).

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

10 La presente descripción proporciona también una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena ligera siguientes: L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30).

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

20 La presente descripción proporciona también una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena ligera del vector GS264 como está depositado en un microorganismo con DSMZ en fecha 23 de enero de 2008, teniendo el número de acceso DSM 21059.

La presente descripción proporciona también una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena pesada del vector GS265 como está depositada en un microorganismo con DSMZ en fecha 23 de enero de 2008, teniendo el número de acceso DSM 21060.

25 La presente descripción proporciona también métodos para producir un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende cultivar las células hospedadoras de la presente descripción de tal manera que el ácido nucleico se exprese y se produzca el anticuerpo. Métodos para producir el anticuerpo vWF humanizado o fragmento de fijación del mismo de la presente descripción pueden comprender adicionalmente recuperar el anticuerpo del cultivo de células hospedadoras. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede recuperarse del medio de células hospedadoras. En algunas realizaciones, antes del cultivo, la célula hospedadora puede someterse a co-transfección con un vector que comprende ácido nucleico codificante de una región variable de cadena pesada y con un vector que comprende ácido nucleico codificante de una región variable de cadena ligera.

30

35 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19, y una secuencia de la región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28.

40 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19, y una secuencia de región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237, y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.

45 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237, y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238 y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para el factor von Willebrand humano (vWF) que comprende regiones CDR correspondientes a las CDRs presentes en el anticuerpo murino NMC-4, una región marco de cadena pesada correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) y una región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6) y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 La presente descripción proporciona también composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7),

HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9), una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específicos para vWF que comprenden las CDRs de cadena ligera, LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12), una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6) y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: CDRs de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9); cadena ligera CDRs: LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12); opcionalmente una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6) y/o una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) y un portador farmacéuticamente aceptable.

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

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena ligera siguientes: L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30) y un portador farmacéuticamente aceptable.

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

Se proporcionan también composiciones que comprenden un primer anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria y un segundo anticuerpo que se fija al dominio A1 de vWF. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo es AJW-200.

35 La presente descripción proporciona también métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombótico) en un individuo (v.g., un humano), comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF humano que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19 y una secuencia de la región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28.

40 La presente descripción proporciona también métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombótico) en un individuo (v.g., un humano), comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237 y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.

45 La presente descripción proporciona también métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombótico) en un individuo (v.g., un humano), comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende regiones CDR correspondientes a las CDRs presentes en el anticuerpo murino NMC-4, una región marco de cadena pesada correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) y una región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).

50 La presente descripción proporciona también métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombótico) en un individuo (v.g., un humano), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO: 9) y una región marco de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).

La enfermedad o trastorno trombotico puede ser una enfermedad cardiovascular o trastornos cerebrovasculares tales como ataque isquémico. En algunas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con diabetes. En algunas realizaciones, la enfermedad trombotica es inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad de células falciformes, rechazo de xenoinjertos, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes. En algunas realizaciones, los trastornos cerebrovasculares pueden incluir ataque isquémico, resultante de infartos en las arterias cerebrales así como infartos lacunares pequeños, y demencia vascular. Los anticuerpos vWF humanizados pueden utilizarse también para prevención de ataques recurrentes o iniciación de ataques desencadenados por inflamación cerebrovascular.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno trombotico puede incluir cáncer.

La presente descripción proporciona métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombotico) en un individuo (v.g., un humano), que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende las CDRs de cadena ligera LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12) y una la región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6) y una región marco de cadena ligera de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEQ ID NO: 6).

La presente descripción proporciona también métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombotico) en un individuo (v.g., un humano), que comprende: administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena pesada siguientes: H2 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 17), H8 (SEQ ID NO: 18), H9 (SEQ ID NO: 19), H12 (SEQ ID NO: 20), H13 (SEQ ID NO: 21), H14 (SEQ ID NO: 22), H15 (SEQ ID NO: 145) o H16 (SEQ ID NO: 146).

La presente descripción proporciona métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombotico) en un individuo (v.g., un humano), que comprende: administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena ligera siguientes: L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30).

La presente descripción proporciona también métodos para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF (v.g., una enfermedad o trastorno trombotico) en un individuo (v.g., un humano), que comprende: administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo, específico para vWF que comprende una de las regiones variables de cadena pesada siguientes H2 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 17), H8 (SEQ ID NO: 18), H9 (SEQ ID NO: 19), H12 (SEQ ID NO: 20), H13 (SEQ ID NO: 21), H14 (SEQ ID NO: 22), H15 (SEQ ID NO: 145) o H16 (SEQ ID NO: 146); y una de las regiones variables de cadena ligera siguientes : L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30).

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado carece de función efectora. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado comprende una región Fc derivada de IgG 4.

La presente descripción proporciona un anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo específico descrito para el factor von Willebrand (vWF), que puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz desde aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces el valor DE<sub>100</sub> sin causar signos clínicos significativos de hemorragia. Preferiblemente, el anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo es específico para el dominio A1 de vWF humano. Más preferiblemente, el anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo específico para vWF es un anticuerpo humanizado o un fragmento de fijación del mismo específico para vWF.

La presente descripción proporciona también un método para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF por administración a un individuo, preferiblemente un humano, de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg, con preferencia desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 20 mg/kg, de modo más preferible desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 10 mg/kg, de modo más preferible desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,4 mg/kg, de modo más preferible desde aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,2 mg/kg, y de modo muy preferible desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg.

La presente descripción proporciona también un método para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF por administración a un individuo que se encuentra en necesidad de ello, de una cantidad terapéuticamente

eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo descrito en esta memoria de una cantidad que oscila desde aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces el valor DE<sub>100</sub>, con preferencia desde aproximadamente 1 a aproximadamente 200 veces el DE<sub>100</sub>, y de modo más preferible desde aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces el DE<sub>100</sub>.

- 5 La presente descripción proporciona también un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF por administración de una o múltiples sub-dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo descrito en esta memoria a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento.

- 10 La presente descripción proporciona también un método para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF por administración subcutánea de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo descrito en esta memoria a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento.

- 15 La presente descripción proporciona también un método para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF por administración intravenosa de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo descrito en esta memoria a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento.

- 20 La presente descripción proporciona también un método para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF por administración intravenosa de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo descrito en esta memoria en serie o en combinación con tratamientos radiológicos (v.g., irradiación o introducción de sustancias radiactivas - tales como aquéllas a las que se hace referencia en UICC (Ed.), *Klinische Onkologie*, Springer-Verlag (1982)) a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento.

Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria pueden utilizarse en la práctica o los ensayos de la presente descripción, se describen los métodos y materiales preferidos.

## 25 **Producción de Anticuerpos del Factor von Willebrand Humanizados**

- Se proporcionan métodos para producir un anticuerpo del factor von Willebrand (vWF) humanizado (v.g., NMC-4 murino) o fragmento de fijación del mismo. Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF puede producirse por transferencia de una o más CDRs o porciones de las mismas de las regiones VH y/o VL de un animal no humano (v.g., ratón) a una o más regiones marco de regiones VH y/o VL humanas.
- 30 Opcionalmente, los residuos marco humanos así presentes en las regiones VH y/o VL pueden reemplazarse por residuos no humanos (v.g., de ratón) correspondientes cuando se necesitan o se desean para mantener afinidad de fijación. Opcionalmente, los residuos de aminoácidos no humanos presentes en las CDRs pueden reemplazarse con residuos humanos.

- 35 Las clasificaciones de marcos y CDRs que se describen en esta memoria (excepto HFR1 y HCDR1) están basadas en el sistema de numeración de Kabat. En esta definición, las CDRs de la cadena pesada contienen los residuos 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); las de la cadena ligera se definen como constituidas por los residuos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Las regiones marco en VH (v.g., región marco 1 de cadena pesada (HFR1), región marco 2 de cadena pesada (HFR2), región marco 3 de cadena pesada (HFR3) y/o región marco 4 de cadena pesada (HFR4)) se definen estando constituidas por los residuos 1-30 (HFR1), 36-49 (HFR2), 66-94 (HFR3); y 103-113 (HFR4); las que se encuentran en VL contienen los residuos 1-23 (LFR1), 35-49 (LFR2), 57-88 (LFR3) y 98-107 (LFR4) (Wu y Kabat, 1970 *J. Exp. Med.* 132: 211). Sin embargo, basándose en la estructura de las CDRs, Chothia definió la CDR1-H indicando que comprendía los residuos 26-32 (Chothia *et al.*, 1992 *J. Mol. Biol.* 227: 799). La definición de AbM (modelización de anticuerpo) es un compromiso entre las dos utilizadas por el software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular, en el cual la CDR1-H contiene los residuos 26-35. Esta es la definición utilizada para los métodos de humanización descritos en esta memoria que utilizan NMC-4.
- 45

- Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para el factor von Willebrand (vWF) puede producirse por transferencia de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la cadena pesada de NMC-4 a una región marco de cadena pesada correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4); y transferencia las CDRs de la cadena ligera de NMC-4 a una región marco de cadena ligera correspondiente a la región marco en la región variable del anticuerpo humano AAK24808 (SEQ ID NO: 6).
- 50

- Un anticuerpo humanizado específico para vWF puede producirse también por transferencia de una o más CDRs de cadena pesada (v.g., HCDR1: GFSLTDYGVD (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNFYDIALDY (SEQ ID NO: 9)) desde la NMC-4 murina a una región marco humana (v.g., de la región variable de AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4).
- 55

Un anticuerpo humanizado específico para vWF puede producirse también por transferencia de una o más CDRs de cadena ligera (v.g., LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO:10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO:11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO:12) a una región marco humana (v.g., de la región variable de AAK94808 (SEQ ID NO: 6)).

5 Un anticuerpo humanizado específico para vWF puede producirse también por transferencia de una o más CDRs de cadena pesada (v.g., HCDR1: GFSLTDYGVV (SEQ ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO: 9)) de NMC-4 murino a una región marco humana (v.g., la región variable de ACC18165.1.1 (SEQ ID NO: 4)), y transferencia de una o más CDRs de cadena ligera (v.g., LCDR1: SASQDINKYLN (SEQ ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEQ ID NO: 12)) a una región marco humana (v.g., de la región variable de AAK93808 (SEQ ID NO: 6)).

10 Un anticuerpo humanizado específico para vWF puede producirse por transferencia de una región variable de cadena pesada modificada que comprende CDR's presentes en NMC-4 y regiones marco humanas (v.g., H2 (SEQ ID NO: 13), H4 (SEQ ID NO: 14), H5 (SEQ ID NO: 15), H6 (SEQ ID NO: 16), H7 (SEQ ID NO: 17), H8 (SEQ ID NO: 18), H9 (SEQ ID NO: 19), H12 (SEQ ID NO: 20), H13 (SEQ ID NO: 21), H14 (SEQ ID NO: 22), H15 (SEQ ID NO: 145) o H16 (SEQ ID NO: 146)) a una región constante humana.

15 Un anticuerpo humanizado específico para vWF puede producirse también por transferencia de una región variable de cadena ligera modificada que comprende las CDR's presentes en NMC-4 y regiones marco humanas (v.g., L5 (SEQ ID NO: 23), L4 (SEQ ID NO: 24), L6 (SEQ ID NO: 25), L7 (SEQ ID NO: 26), L8 (SEQ ID NO: 27), L9 (SEQ ID NO: 28), L10 (SEQ ID NO: 29) o L11 (SEQ ID NO: 30) a una región constante humana.

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

25 En un intento para reducir adicionalmente la antigenicidad de los anticuerpos humanizados, pueden cambiarse (v.g., sustituirse) los residuos en las CDRs (v.g., residuos murinos) en lugar de un residuo de aminoácido humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V34W en HCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones S61P y/o A62S en HCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones S24Q, N30S y/o K31N en LCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T, en LCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V24W en HCDR1; una o más sustituciones E61P y/o A62S en HCDR2; una o más sustituciones S24Q, N30S y/o K31N en LCDR1; y una o más sustituciones Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T, en LCDR2.

30 Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos a fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

35 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo de anticuerpos humanizados. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, v.g., Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical y Biophysical Methods, 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las bibliotecas de fago de anticuerpos expuestas anteriormente. Alternativamente, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> directamente a partir de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el técnico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase WO 1993/16185; Patente U.S. No 5.571.894; y Patente U.S. No 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", v.g., como se describe en la Patente U.S. No 5.641.870, por ejemplo.

40 De acuerdo con un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de fijación deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulinas. La fusión tiene lugar preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la fijación de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. DNAs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y,

en caso deseado, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan a un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que ratios desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos optimizados. No obstante, es posible insertar las secuencias codificantes para las dos o tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en ratios iguales da como resultado rendimientos altos o cuando las ratios no tienen significación particular alguna.

La descripción se refiere también a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (v.g., una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de procedencia bacteriana, fúngica, vegetal o animal, con inclusión de fragmentos y/o variantes de las mismas), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

La presente descripción contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (v.g., una ribonucleasa o una DNA-endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Están disponibles una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos de vWF humanizados radioconjugados. Ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu.

Conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico pueden producirse utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridiltiol)-propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de iminoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como aldehído glutárico), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno-2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno-triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para conjugación de un radionucleido al anticuerpo (véase WO 1994/11026). El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, pueden utilizarse un enlazador lábil en medio ácido, enlazador sensible a peptidasas, enlazador dimetilico, o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.* *Cancer Research*, 52:127-131 (1992)).

Alternativamente, puede producirse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo vWF humanizado y agente citotóxico, v.g., por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

En otra realización adicional, el anticuerpo vWF humanizado puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en pre direccionamiento a tumores, en donde se administra al paciente el conjugado anticuerpo-receptor, seguido por retirada de la circulación del conjugado no fijado utilizando un agente de aclaramiento, y seguido después por administración de un "ligando" (v.g., avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (v.g., un radionucleótido).

Los anticuerpos de la presente descripción pueden utilizarse también en ADEPT por conjugación del anticuerpo vWF humanizado a una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (v.g., un agente quimioterapéutico peptidílico, véase WO 1981/01145) en un fármaco anti-cáncer activo (véase v.g., WO 1988/07378 y la Patente U.S. No 4.975.278).

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que convierta el mismo en su forma citotóxica, más activa.

Enzimas que son útiles incluyen, pero sin carácter limitante, fosfatasas alcalina útiles para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasas útiles para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina-desaminasas útiles para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de Serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como las catepsinas D y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de β-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como β-galactosidasa y neuroaminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasas útiles para convertir fármacos derivatizados con β-lactamas en fármacos libres; y penicilin-amidasas, tales como penicilin-amidasa V o penicilin-amidasa G, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos con actividad enzimática, conocidos también en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la descripción en fármacos activos libres (véase, v.g., Massey, *Nature*, 328: 457-458 (1987)). Conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe en esta memoria para suministro de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas pueden unirse covalente a los anticuerpos vWF humanizados por métodos bien conocidos en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales arriba expuestos. Alternativamente, pueden

construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de fijación de antígeno de un anticuerpo de la descripción enlazado a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima adecuada utilizando métodos de DNA recombinante bien conocidos en la técnica (véase, *v.g.*, Neuberger *et al.*, Nature, 312: 604-608 (1984)).

5 Otras modificaciones de los anticuerpos se contemplan en esta memoria. Por ejemplo, un anticuerpo puede enlazarse a uno de una diversidad de polímeros no proteináceos, *v.g.*, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo puede atraparse también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente),  
10 en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 16<sup>a</sup>, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos de vWF humanizados descritos en esta memoria pueden formularse también como inmunoliposomas. Liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); Patentes de EE.UU. Núms. 4,485,045 and 4,544,545; y WO 1997/38731 publicado en 23 de octubre 1997. Liposomas con tiempo circulación mejorado se dan a conocer en la Patente U.S. No 5.013.556.

Liposomas particularmente útiles pueden generarse por el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente descripción pueden conjugarse a los liposomas como se describe en Martin *et al.* J. Biol. Chem., 237: 286-288 (1982) por una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente en el liposoma. Véase Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., (1 (19):1484 (1989).

#### **Vectores, Células Hospedadoras y Métodos Recombinantes**

25 La presente descripción proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos humanizados específicos para vWF y fragmentos de fijación de los mismos, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción de un anticuerpo o fragmento de fijación del mismo.

Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que codifica el mismo puede aislarse e insertarse en un vector replicable para clonación ulterior (amplificación del DNA) o para expresión. DNA que codifica un anticuerpo monoclonal puede aislarse y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (*v.g.*, por utilización de sondas oligonucleotídicas que son capaces de fijarse específicamente a genes que codifican cadenas pesada y ligera de un anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Componentes de los vectores incluyen generalmente, pero sin carácter limitante, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

##### *(i) Componente de Secuencia Señal*

Anticuerpos vWF humanizados como se describe en esta memoria pueden producirse recombinantemente no sólo de modo directo, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el término N de la proteína o polipéptido maduro. Una secuencia señal heteróloga puede ser preferiblemente una que es reconocida y procesada (*es decir*, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan la secuencia señal del anticuerpo vWF humanizado nativa, la secuencia señal puede sustituirse por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o conductores termoestables de enterotoxina II. Para secreción de levadura, una secuencia señal nativa puede sustituirse por, *v.g.*, un conductor de invertasa de levadura, un conductor de factor  $\alpha$  (con inclusión de conductores del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), un conductor de fosfatasa ácida, un conductor de glucoamilasa de *C. albicans*, o una señal descrita en WO 1990/13646. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como conductores secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

50 El DNA para dicha región precursora puede ligarse en marco de lectura a DNA codificante de un anticuerpos vWF humanizado.

##### *(ii) Componente Origen de Replicación*

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que hace posible que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia puede hacer posible que el vector se replique con independencia del DNA cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Tales secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es

adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para levadura, y diversos orígenes de replicación (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (el origen de replicación de SV40 puede utilizarse sólo típicamente debido a que contiene el promotor precoz).

### (iii) Componente del Gen de Selección

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

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que son transformadas con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y sobreviven por tanto al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquéllos que hacen posible la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico codificante del anticuerpo vWF humanizado, tal como DHFR, timidina-quinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina-desamidasa, ornitina-descarboxilasa, etc.

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

Alternativamente, células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo salvaje que contienen DHFR endógena) transformadas o co-transformadas con secuencias de DNA que codifican un anticuerpo vWF humanizado, proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicosido-3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento de las células en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, v.g., kanamicina, neomicina, o G418 (véase, v.g., la patente U.S. No 4.965.199).

Un gen de selección adecuado para uso en levadura puede ser el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona luego un ambiente eficaz para detección de la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. Análogamente, cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 ó 38...626) pueden complementarse por plásmidos conocidos portadores del gen *Leu2*.

Adicionalmente, vectores derivados del plásmido circular de 1,6  $\mu$ m pKD1 pueden utilizarse para transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, un sistema de expresión para producción en gran escala de quimosina recombinante de ternero ha sido consignado para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990). Vectores de expresión multi-copia estables para secreción de seroalbúmina humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces* han sido descritos también. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

### (iv) Componente Promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen usualmente un promotor que puede ser reconocido por el organismo hospedador y puede estar enlazado operativamente al ácido nucleico codificante de anticuerpos de vWF humanizados. Promotores adecuados para uso con hospedadores procariontes incluyen un promotor *phoA*, sistemas promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como un promotor *lac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos pueden contener también una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) enlazada operativamente al DNA codificante de un anticuerpo vWF humanizado.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sitio en el que puede iniciarse la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases aguas arriba del comienzo de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT (SEQ ID NO: 31) donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas se encuentra una secuencia AATAAA (SEQ ID NO: 32) que puede ser la señal para adición de la cola poli-A al extremo 3' de la secuencia codificante. Estas secuencias pueden insertarse convenientemente en vectores de expresión eucariotas. Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso como hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato-quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehido-3-fosfato-

deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato-descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfoglicerato-mutasa, piruvato-quinasa, triosafosfato-isomerasa, fosfoglucosa-isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, pueden ser las regiones promotoras para alcohol-deshidrogenasa, 2-isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen ulteriormente (véase, v.g., la Patente Europea 73.657). Se utilizan también ventajosamente intensificadores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos vWF humanizados a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero puede ser controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma de los bovinos, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y muy preferiblemente el Virus 40 de los Simios (SV40), promotores heterólogos de mamífero, v.g., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y promotores del choque térmico, con tal que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

Los promotores precoz y tardío del virus SV40 pueden obtenerse convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que contiene también el origen de replicación viral de SV40. El promotor inmediato precoz del megalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII. Un sistema para expresión de DNA en hospedadores de mamífero que utiliza el virus del papiloma de los bovinos como vector (véase, v.g., la Patente U.S. No 4.419.446). Una modificación de este sistema se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. No 4.601.978. Reyes *et al.*, Nature, 297: 598-601 (1982) describe la expresión de cDNA del interferón  $\beta$  humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina-quinasa del virus del herpes simplex. Alternativamente, puede utilizarse como promotor la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous.

#### (v) Componente del Elemento Intensificador

La transcripción de un DNA que codifica los anticuerpos vWF humanizados de esta descripción por eucariotas superiores puede aumentarse por inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Se conocen ahora secuencias intensificadoras útiles de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Típicamente, son útiles también, sin embargo, y pueden utilizarse secuencias intensificadoras de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el intensificador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pares de bases 100-270), el intensificador del promotor precoz del citomegalovirus, el intensificador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus. Yaniv, Nature 197: 17-18 (1982) describe también elementos intensificadores para activación de promotores eucariotas. Un intensificador puede remodelarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia codificante del anticuerpo vWF humanizado, si bien está localizado preferiblemente en el sitio 5' respecto del promotor.

#### (vi) Comprenden de Terminación de la Transcripción

Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros seres vivos multicelulares) pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilización del mRNA. Tales secuencias están disponibles comúnmente del extremo 5', ocasionalmente del extremo 3', de regiones no traducidas de DNAs o cDNAs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica el anticuerpo vWF humanizado. Un componente útil de terminación de la transcripción es una región de poliadenilación de la hormona del crecimiento de los bovinos (véase, v.g., WO 1994/11026 y los vectores de expresión descritos en dicho lugar).

#### (vii) Selección y Transformación de Células Hospedadoras

Células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión del DNA en vectores incluyen diversas células procariontas, de levadura, o de eucariotas superiores. Procariontas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, v.g. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, v.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, v.g., *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, pseudomonas tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Hospedadores de clonación de *E. coli* incluyen *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325).

Además de procariontas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores adecuados de clonación o expresión para vectores codificantes de anticuerpos de vWF humanizados. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de los panaderos, es útil para expresión. Adicionalmente, numerosos otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y pueden ser útiles, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, v.g., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos

tales como, v.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo vWF humanizado glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células eucariotas incluyen células de plantas, insectos y vertebrados. 5  
Numerosas cepas y variantes de baculovirus y células hospedadoras permisivas correspondientes de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de los frutos), y *Bombyx mori* han sido identificadas. Una diversidad de células virales para transfección están disponibles públicamente, v.g., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden utilizarse en esta memoria como el virus conforme a la presente descripción, 10 particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco pueden utilizarse también como hospedadores.

Sin embargo, el interés máximo se ha puesto en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células 15 hospedadoras de mamífero útiles incluyen células ChK2 (Chromos Molecular Systems, Inc.); la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células 293 de riñón de embrión humano (HEK) (Simmons, 1990 Exp Physiol. 75:309); células de fusión b SP2 (Haas y Wabl, 1984, PNAS 81:7185); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980), con inclusión de las líneas de células DG44 (Urlaub *et al.*, Som. Cell y Mol. Gen., 12: 555-566 (1986)) y DP12); células Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. 20 Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; 25 células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación arriba descritos para producción de anticuerpos vWF humanizados y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como apropiados para inducción de promotores, selección de 30 transformantes, o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

Líneas de células estables que expresan niveles altos de anticuerpo pueden utilizarse también para producir el anticuerpo humanizado de la presente descripción. Por ejemplo, un sistema de expresión de proteínas de mamífero de alta producción que está basado en una plataforma murina de Expresión de Cromosomas Artificiales (ACE) que ha sido modificado por ingeniería a fin de contener sitios aceptores de recombinación múltiples específicos del sitio 35 puede cargarse con secuencias de genes heterólogos utilizando una integrasa lambda mutante (v.g., integrasa ACE en combinación con un vector lanzadera de direccionamiento (Lindenbaum *et al.*, Nucl. Acid Res. 32 (21):e172 (2004); Solicitudes de Patente de EE.UU. Núms. 2003/0119104A1 y 2006/0246586 A1). Este sistema puede utilizarse para generar líneas de células estables para expresión de variantes humanizadas seleccionadas y la quimera NMC-4.

#### 40 (viii) Cultivo de las Células Hospedadoras

Células hospedadoras útiles para producir un anticuerpo vWF humanizado pueden cultivarse en una diversidad de medios. Medios disponibles comercialmente tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos, por ejemplo, en Ham *et al.*, 45 Meth. Enz. 58:44 (1979); Barnes *et al.*, Anal. Biochem., 102:255 (1980); Patentes de EE.UU. Núms. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 1990/03430; WO 1987/00195; o Patente U.S. Re. 30,985 puede utilizarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse en caso necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (v.g., insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (v.g., cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (v.g., HEPES), 50 nucleótidos (v.g., adenosina y timidina), antibióticos (v.g., el fármaco GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes usualmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquiera otros suplementos necesarios pueden incluirse también a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Una diversidad de condiciones de cultivo, tales como temperatura y pH, pueden utilizarse con la célula hospedadora seleccionada para expresión.

#### 55 (ix) Purificación del Anticuerpo vWF Humanizado

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, un anticuerpo puede producirse intracelularmente o en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si un anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, los residuos particulados, se trate de células hospedadoras o fragmentos lisados, pueden separarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. (Carter *et al.*, BiolTechnology, 10: 163-167 (1992)) describe un

- procedimiento para aislamiento de anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Resumidamente, se descongela una pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos de células pueden separarse por centrifugación. Cuando se secreta un anticuerpo en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primeramente por regla general, con inclusión de la utilización de un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON™ o MILLIPORE PELLICON™. Puede incluirse un inhibidor de proteasas tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en cualquiera de los pasos anteriores a fin de inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos a fin de prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.
- Una composición de anticuerpos preparada a partir de células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas humanas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 62: 1-13 (1983)). Puede utilizarse proteína G para isotipos de ratón y para  $\gamma 3$  humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se fija un ligando de afinidad puede ser agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más breves que los que pueden conseguirse con agarosa. Donde un anticuerpo comprende un dominio C<sub>H</sub>3, puede utilizarse para purificación la resina BAKERBOND ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, L.J.). Otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina-SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio de aniones o cationes (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio están disponibles también dependiendo del anticuerpo a recuperar.

#### Formulaciones Farmacéuticas

- Se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo humanizado específico para vWF. Las formulaciones de anticuerpos vWF humanizados pueden prepararse para almacenamiento por mezcla de un anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 16ª, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes con inclusión de ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil-parabenos tales como metil- o propil-parabén; catecol, resorcinol, ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menor que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina; glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos con inclusión de glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones de carga opuesta formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (v.g. complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Formulaciones de vWF humanizado liofilizadas preferidas se describen en WO 1997/04801, que se incorpora expresamente en esta memoria por referencia.

- La formulación de esta memoria puede contener también más de un compuesto activo en caso necesario para la indicación particular de que se trate, preferiblemente aquéllas con actividades complementarias que no afectan desfavorablemente unas a otras. Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, fármaco de vWG humanizado, agente antiangiogénico, y/o cardioprotector. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito deseado.

- Los ingredientes activos pueden estar atrapados también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se exponen en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 16ª, Osol, A. Ed. (1980).

- Pueden fabricarse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que se encuentran en forma de artículos conformados, v.g. films, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (v.g., poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente U.S. No 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acrilato de vinilo no degradable, copolímeros degradables ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPROL DEPO™

(microesferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de neuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a utilizar para administración en vivo tienen que ser estériles. Esto puede realizarse por filtración a través de membranas de filtración estériles.

#### 5 Tratamiento con Anticuerpos vWF Humanizados

Los anticuerpos vWF humanizados o fragmentos de fijación de los mismos pueden utilizarse para tratar diversas enfermedades o trastornos relacionados con vWF. Afecciones o trastornos ilustrativos incluyen enfermedades o trastornos tromboticos. Las enfermedades o trastornos tromboticos pueden incluir enfermedad cardiovascular o trastornos cerebrovasculares tales como ataque isquémico. En algunas realizaciones, una enfermedad cardiovascular puede ser aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con diabetes. En algunas realizaciones, una enfermedad trombotica puede ser inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad de células falciformes, rechazo de xenoinjertos, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes. En algunas realizaciones, los trastornos cerebrovasculares incluyen ataque isquémico, resultante de infartos de las arterias cerebrales así como infartos lacunares pequeños, y demencia vascular. Los anticuerpos vWF humanizados pueden utilizarse también para prevención de ataques recurrentes o iniciación de ataques desencadenados por inflamación cerebrovascular. En el caso del síndrome coronario agudo, los anticuerpos vWF humanizados o fragmentos de fijación de los mismos son particularmente adecuados para el tratamiento de individuos diagnosticados del segmento ST. Los anticuerpos vWF humanizados o fragmento de fijación de los mismos pueden utilizarse también para tratamiento post-quirúrgico a fin de evitar formación de coágulos.

Además, la sobreexpresión o amplificación de vWF puede evaluarse utilizando un ensayo de diagnóstico en vivo, v.g. por administración de una molécula (tal como un anticuerpo) que fija la molécula a detectar y está marcado con una etiqueta detectable (v.g. un isótopo radiactivo) y escaneo externo del paciente para localización del marcador.

En ciertas realizaciones, puede administrarse al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo vWF humanizado conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, un inmunoconjugado y/o anticuerpo vWF humanizado al que está fijado aquél es/son internalizado(s) por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica incrementada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa a la que se fija el mismo. En una realización preferida, un agente citotóxico (incluyendo por ejemplo, maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas, y DNA-endonucleasas) se direcciona a o interfiere con ácido nucleico en la célula de cáncer. En otra realización, un agente citotóxico (v.g. taxanos o epotilonas) puede estar direccionado a o interferir con los microtúbulos y la mitosis dependiente de microtúbulos en la célula de cáncer.

Los anticuerpos o inmunoconjugados de vWF humanizados se pueden administrar a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, v.g., como un bolo o por infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, o de inhalación. Se prefiere la administración intravenosa, intraperitoneal o subcutánea del anticuerpo, siendo particularmente preferidas las rutas subcutánea o intraperitoneal. Un protocolo de administración preferido puede ser una sola dosis para un trastorno agudo o aproximadamente una vez cada 3 a 4 semanas para un trastorno crónico, dependiendo del mamífero particular que se esté tratando, el tipo de anticuerpo, y otros factores bien conocidos por el especialista. Sin embargo, son operativos en esta invención otros protocolos de administración.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de anticuerpo vWF humanizado. Una administración combinada incluye co-administración, utilizando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente puede existir cierto periodo de tiempo mientras ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

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

Puede ser deseable también combinar la administración de un anticuerpo o anticuerpos vWF humanizados con administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado con tumores.

En una realización, el tratamiento de la presente descripción implica la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) vWF humanizado(s) y uno o más reguladores de la función inmune en un mamífero, tales como citocinas, así como agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluyen la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o como sea determinado empíricamente por el técnico experto. Protocolos de preparación y dosificación

para dicha quimioterapia se describen también en *Chemotherapy Service*, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

Un anticuerpo vWF humanizado puede combinarse con un compuesto anti-hormonal, v.g. un compuesto anti-estrógenos tal como tamoxifeno o un inhibidor de las aromatasas tal como anastrozol; una anti-progesterona tal como onapristona (véase, EP 616812); o un anti-andrógeno tal como flutamida, en dosis conocidas para tales moléculas. En el caso en que el cáncer a tratar es un cáncer independiente de hormonas, un paciente puede haber sido sometido previamente a terapia anti-hormonal y, después que el cáncer se hace independiente de las hormonas, el anticuerpo vWF humanizado (y opcionalmente otros agentes como se describen en esta memoria) puede administrarse al paciente.

- 10 Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo puede administrarse para propósitos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico encargado del caso. El anticuerpo puede administrarse adecuadamente al paciente en una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, así como de la tasa de aclaramiento del anticuerpo, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (v.g. 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidato inicial para administración al paciente, sea, por ejemplo por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría ser comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores arriba mencionados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento puede prolongarse hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

- Una dosis preferida de un anticuerpo vWF humanizado puede estar comprendida en el intervalo que va desde aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Así, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, v.g., cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas (v.g. tal que el paciente reciba desde aproximadamente 2 a aproximadamente 20, v.g. aproximadamente 6 dosis, del anticuerpo vWF humanizado). Puede administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguida por una o más dosis menores. Un régimen de dosificación ilustrativo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo vWF humanizado o fragmento de fijación del mismo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia puede ser monitorizado fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

- En estudios para evaluar la eficacia y seguridad de un anticuerpo vWF humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria en los babuinos, se ha encontrado, sorprendentemente, que un anticuerpo humanizado de esta clase es eficaz en la prevención (v.g., reducción, disminución o mejora) de la agregación plaquetaria in vivo a una dosis muy baja, v.g. en el intervalo de pocos µg/kg, lo cual es un resultado inesperado y sin precedentes para tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF. Signos clínicos de hemorragia, con la excepción de un aumento hemorrágico por pequeños cortes (v.g. prolongación del tiempo de sangrado del modelo y/o volumen de hemorragia tal como se mide en el ensayo de sangrado incisional), no se observan a estas concentraciones. Aún más sorprendentemente, a dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la DE<sub>100</sub>, no se observan signos clínicos significativos de hemorragia, aunque se observa un aumento de las hemorragias producidas por cortes pequeños. Por consiguiente, un anticuerpo vWF humanizado o un fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria parece ser eficaz para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF en humanos.

- Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria puede administrarse por tanto a un individuo, preferiblemente un humano, en una cantidad terapéuticamente eficaz que oscila desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg. Preferiblemente, una cantidad terapéuticamente eficaz que oscila desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz que oscila desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 10 mg/kg, y en particular desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,4 mg/kg, de modo más particular desde aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,2 mg/kg, y de modo muy particular desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg se administra a un individuo, preferiblemente un humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo puede administrarse a un individuo en una o más dosis terapéuticamente eficaces. Una cantidad terapéuticamente eficaz administrada es usualmente insuficiente para causar signos clínicos significativos de hemorragia, pero suficiente para inhibir la agregación plaquetaria, es decir puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz sin causar signos clínicos significativos de hemorragia (v.g. sin causar signos clínicos de hemorragia excepto por un sangrado incrementado por cortes pequeños).

- Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria puede administrarse a un individuo, preferiblemente un humano, en una dosis terapéuticamente eficaz que oscila desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,4 mg/kg o en particular desde aproximadamente 0,005 a

aproximadamente 0,2 mg/kg, de modo más particular desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg para producir un efecto terapéutico (v.g., una reducción en la formación de trombos) en un individuo.

Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz que oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 250 veces la DE<sub>100</sub>, con preferencia entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 veces la DE<sub>100</sub>, y de modo más preferible entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 veces la DE<sub>100</sub> sin causar signos clínicos significativos de hemorragia (v.g., sin causar signos clínicos de hemorragia excepto por un pequeño aumento de hemorragia por cortes pequeños). Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo como se describe en esta memoria puede administrarse como una sola subdosis o múltiples subdosis al individuo. Las dosis terapéuticamente eficaces anteriores se prefieren para administración intravenosa. En la administración por la ruta subcutánea, la cantidad total administrada preferida puede estar comprendida en el intervalo de aproximadamente 1 a 3 veces la cantidad administrada por la ruta intravenosa, con preferencia aproximadamente 2 veces.

Signos clínicos de hemorragia pueden referirse a la clasificación BleedScore como se describe por Serebruan y Atar (American Journal of Cardiology, 2007, Volumen 99, Número 2, 15 de enero 2007, páginas 288-290) y aplicarse a modelos animales. El BleedScore ha sido desarrollado específicamente para registrar el tipo de hemorragia que es característico para las terapias antiplaquetarias. El BleedScore está basado en la asignación de puntos a hallazgos clínicos que dependen de la gravedad de la hemorragia. Por suma de los puntos de todos los hallazgos, se obtiene un registro resultante. Los síntomas de hemorragia se dividen en tres categorías de gravedad creciente: 1) hemorragia superficial (un punto de registro por suceso), 2) hemorragia interna (3 puntos de registro por suceso), 3) hemorragia alarmante, o una combinación de éstas (6 puntos de registro por evento). Este enfoque es particularmente útil en la determinación e información de eventos hemorrágicos leves a moderados asociados con las modernas terapias antiplaquetarias y antitrombóticas, si bien tiene en cuenta asimismo las complicaciones hemorrágicas más graves. La hemorragia superficial comprende los criterios siguientes: contusión natural, hemorragia por pequeños cortes (v.g. tiempo de hemorragia prolongado del modelo), petequia, equimosis. La Hemorragia Interna comprende los siguientes criterios: hematoma, epistaxis, pérdida de sangre por boca, vagina, melena, hemorragia oftálmica, hematuria, hematemesis. La hemorragia alarmante comprende los criterios siguientes: necesidad de transfusión, intracraneal, y amenazante para la vida.

La inhibición de la agregación plaquetaria (que inhibe la agregación de las plaquetas o que es suficiente para inhibir la agregación de las plaquetas) puede indicar que la cantidad terapéuticamente eficaz administrada es suficiente para inhibir la formación de un trombo oclusivo en una arteria lesionada artificialmente en un modelo animal de tensión arterial como se mide por la monitorización del flujo de sangre a través de la arteria. Un enfoque para determinar la inhibición in vivo de la agregación plaquetaria de una manera cuantitativa es por la medida de reducciones cíclicas de flujo (CFRs) en un modelo de lesión arterial. Así, por ejemplo, la inhibición de la agregación plaquetaria puede indicar que la cantidad terapéuticamente eficaz administrada es suficiente para reducir el número de CFRs en un animal.

Cantidad terapéuticamente eficaz o cantidad eficaz pueden hacer referencia a una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del individuo que se esté tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está perfectamente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente en vista de la descripción detallada proporcionada en esta memoria. Una cantidad terapéuticamente eficaz como se describe en esta memoria incluye una cantidad de un anticuerpo vWF eficaz para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF en un individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo vWF incluye una cantidad necesaria para tratar o inhibir la agregación plaquetaria (v.g. durante trombosis en arterias principales, arterias periféricas, arteriolas o venas).

Dosis terapéuticamente eficaz o dosis eficaz puede hacer referencia a una dosis que es eficaz para mejorar o prevenir los síntomas o prolongar la supervivencia de un individuo objeto de tratamiento. Una dosis terapéuticamente eficaz como se describe en esta memoria incluye una dosis de un anticuerpo vWF eficaz para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF en un individuo. Una dosis terapéuticamente eficaz como se describe en esta memoria incluye una dosis que inhibe la agregación de las plaquetas (v.g. durante trombosis en arterias principales, arterias periféricas, arteriolas o venas). Una dosis terapéuticamente eficaz incluye una DE<sub>100</sub> que es la dosis eficaz suficiente para reducir en un 100% la formación de un trombo como se mide por la reducción del flujo de sangre en un vaso sanguíneo. La DE<sub>100</sub> como se describe en esta memoria incluye una cantidad de anticuerpo vWF suficiente para reducir a 0 el número de reducciones de flujo a lo largo de un periodo de 30 minutos. Dosis terapéuticamente eficaces incluyen aquellas dosis que producen una reducción en la formación de trombos, por ejemplo, una dosis suficiente para reducir al menos en aproximadamente un 15%, preferiblemente al menos en un 30%, más preferiblemente en al menos 50%, muy preferiblemente en al menos 80%, en particular en al menos 100% la formación de un trombo como se mide por la reducción del flujo sanguíneo en un vaso sanguíneo o por tests ex vivo adecuados que miden la reducción de la agregación plaquetaria.

Alternativamente, un anticuerpo vWF humanizado puede administrarse convenientemente en serie o en combinación con tratamientos radiológicos (v.g., irradiación o introducción de sustancias radiactivas tales como las que se consignan en UICC (Ed.), Klinische Onkologie, Springer-Verlag (1982)).

La presente descripción proporciona por tanto un anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo específico para el factor von Willebrand (vWF), que puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz comprendida entre 1 vez y aproximadamente 250 veces la DE<sub>100</sub> sin causar signos clínicos significativos de hemorragia. Preferiblemente, el anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo es específico para el dominio A1 de vWF humano. Con preferencia, el anticuerpo humano o fragmento de fijación del mismo específico para vWF es un anticuerpo humanizado o un fragmento de fijación del mismo específico para vWF.

#### Artículos de Fabricación

En otra realización de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos arriba descritos (v.g. un anticuerpo vWF humanizado). El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto en el paquete o asociado con el recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales o jeringuillas. Los recipientes pueden estar hechos de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que puede ser eficaz para tratar la afección y puede tener una abertura de acceso estéril (v.g., el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición puede ser el anticuerpo vWF humanizado descrito en esta memoria. La etiqueta o prospecto en el paquete puede indicar que la composición puede utilizarse para el tratamiento de la afección de elección, tal como cáncer. En una realización, la etiqueta o prospecto en el paquete puede indicar que la composición que comprende el anticuerpo humanizado vWF puede ser utilizada para tratar un trastorno relacionado con vWF.

Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en él, en donde la composición comprende el anticuerpo humanizado de esta invención, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en él, en donde la composición comprende un agente terapéutico distinto del anticuerpo humanizado. El artículo de fabricación en esta realización de la descripción puede comprender adicionalmente un prospecto en el paquete que indique que las composiciones primera y segunda pueden utilizarse en combinación para tratar una enfermedad o trastorno relacionada con vWF. Dicho agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección que antecede (v.g. un agente trombolítico, un agente antiplaquetario, un agente quimioterapéutico, un agente anti-angiogénico, un compuesto anti-hormonal, un cardioprotector, y/o un regulador de la función inmune en un mamífero, con inclusión de una citocina. Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El mismo puede contener además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, con inclusión de otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringuillas.

#### Usos no Terapéuticos para el Anticuerpo vWF Humanizado

Los anticuerpos vWF humanizados o fragmentos de fijación de los mismos tienen adicionalmente aplicaciones no terapéuticas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos pueden estar inmovilizados sobre una fase sólida tal como por ejemplo, una resina SEPHADEX™ o papel de filtro, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado puede estar en contacto con una muestra que contiene la proteína vWF humanizada (o fragmento de la misma) a purificar, y después de ello el soporte puede lavarse con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente la totalidad del material en la muestra excepto la proteína vWF humanizada, que puede fijarse al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte puede lavarse con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará la proteína vWF humanizada del anticuerpo.

Los anticuerpos vWF humanizados pueden ser útiles también en ensayos de diagnóstico para la proteína vWF humana, v.g. detectando su expresión en células, tejidos o suero específicos. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo puede estar marcado con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las categorías siguientes:

(a) Radioisótopos, tales como <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H y <sup>131</sup>I. El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse utilizando recuento de centelleo.

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, lissamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Los marcadores fluorescentes pueden estar conjugados al anticuerpo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, supra, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse utilizando un fluorímetro.

(c) Están disponibles diversos marcadores enzima-sustrato (véase, v.g., la Patente U.S. No 4.275.149). Estas enzimas catalizan generalmente una alteración química del sustrato cromógeno que puede medirse utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Téc-

nicas para cuantificar un cambio de fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente llega a excitarse electrónicamente por una reacción química y puede emitir luego luz que puede medirse (v.g., utilizando un quimioluminómetro) o cede energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (v.g., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente U.S. No 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato-deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tales como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido-oxidasas (v.g. glucosa-oxidasa, galactosa-oxidasa, y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (v.g. uricasa y xantina-oxidasa), lactoperoxidasa y microperoxidasa. Técnicas para conjugación de enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al*, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzym.* (Ed., J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

Ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRP) con hidrogeno-peroxidasa como sustrato, en donde la hidrogeno-peroxidasa oxida un precursor de tinte (v.g., ortofenileno-diamina (OPD) o hidrocloreuro de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB));

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

(iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromógeno (v.g., p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o el sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil-p- $\beta$ -galactosidasa.

Numerosas otras combinaciones enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la técnica (véanse, v.g., Patentes U.S. Núms. 4.275.149 y 4.318.980).

A veces, el marcador puede estar conjugado indirectamente con el anticuerpo. El profesional experto será conocedor de diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar conjugado con biotina, y cualquiera de las tres categorías amplias de marcadores arriba mencionados puede estar conjugada con avidina, o viceversa. La biotina se fija selectivamente a avidina, y por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo puede conjugarse con un pequeño hapteno (v.g., digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores arriba mencionados puede conjugarse con un anticuerpo anti-hapteno (v.g., anticuerpo anti-digoxina). Así, puede conseguirse una conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

En otra realización de la descripción, el anticuerpo vWF humanizado no precisa estar marcado, y la presencia del mismo puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado que se fije al anticuerpo vWF humanizado.

Los anticuerpos de la presente descripción pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de fijación competitiva, ensayos sándwich directos o indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

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

Los anticuerpos pueden utilizarse también para ensayos de diagnóstico en vivo. Generalmente, el anticuerpo puede estar marcado con un radionucleido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ), de tal modo que, por ejemplo, un tumor puede localizarse utilizando inmunoescintigrafía.

Por razones de conveniencia, los anticuerpos de la presente descripción pueden proporcionarse en un kit (v.g., una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realización del ensayo de diagnóstico). Si el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (v.g., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Adicionalmente, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (v.g., un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y análogos. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden modificarse ampliamente a fin de proporcionar las concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, con inclusión de excipientes que al disolverse proporcionarán una solución de reactivos que tenga la concentración apropiada.

Los anticuerpos vWF humanizados pueden ser útiles también para obtención de imágenes *in vivo*, donde el anticuerpo marcado puede administrarse a un hospedador, preferiblemente el torrente sanguíneo, y la presencia y localización del anticuerpo marcado en el hospedador puede ensayarse. Esta técnica de obtención de imágenes puede utilizarse convenientemente en la localización de émbolos vasculares o la estadificación y el tratamiento de neoplasmas. El anticuerpo puede marcarse convenientemente con cualquier resto que sea detectable en un hospedador, con inclusión, por ejemplo, de indicadores no radiactivos detectables por, v.g., resonancia magnética nuclear, u otros medios conocidos en la técnica. Preferiblemente, sin embargo, el marcador puede ser un radiomarcador, con inclusión de yodo, v.g.  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ , selenio, quelatos bifuncionales, cobre, v.g.  $^{67}\text{Cu}$ , tecnecio (v.g.,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y renio (v.g.,  $^{186}\text{Re}$  y  $^{188}\text{Re}$ ). El radioisótopo puede estar conjugado con la proteína por cualquier medio,

incluyendo por ejemplo compuestos formadores de quelatos con metales o lactoperoxidasa, o técnicas lodogen para yodación.

**Depósito del Material:**

5 Los materiales siguientes han sido depositados con la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania:

10 Un microorganismo (*E. coli*) depositado con DSMZ en fecha 23 de enero 2008, que tiene el No. de acceso DSM 21059), comprendiendo el vector GS264 que comprende ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena ligera de la variante H9L9IgG4 de NMC-4 humanizado. Un microorganismo (*E. coli*) depositado con DSMZ en fecha 23 de enero de 2008, que tiene el No. de acceso DSM 21060, que comprende el vector GS265 que comprende ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena pesada de NMC-4, variante H9L9IgG4. Estos depósitos se prepararon conforme a las estipulaciones del Tratado de Budapest acerca del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Propósito de Procedimiento de Patentes y las Regulaciones Incluidas en el mismo (Tratado de Budapest).

15 Sin descripción adicional, se cree que una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede, utilizando la descripción que antecede y los ejemplos ilustrativos que siguen, producir y utilizar los agentes de la presente descripción y practicar los métodos reivindicados. Los ejemplos prácticos siguientes se proporcionan a fin de facilitar la práctica de la presente descripción, y no deben interpretarse como limitantes del resto de la descripción en modo alguno.

**EJEMPLOS**

20 **Ejemplo 1: Construcción de Anticuerpos Quiméricos**

25 **Generación de una quimera NMC-4-Fc Humana:** Se construye un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables del anticuerpo de ratón NMC-4 y una región Fc humana como se describe a continuación. En un método ilustrativo, el anticuerpo anti-vWF, NMC-4 (v.g., una IgG1k con secuencias de aminoácidos de la región variable que han sido publicadas) se utiliza como modelo para generar secuencias génicas sintéticas para las regiones VH y VL de NMC-4 (Celikel *et al.*, 1997, Blood Cells, Molecules and Diseases 23: 123-134). Por ejemplo, secuencias de genes sintéticos para VH y VL de NMC-4 se generan por captura de las secuencias de aminoácidos descritas en Celikel *et al.*, y generación de una secuencia de nucleótidos correspondiente utilizando el software VECTOR NTI.

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

Cebador Directo	Secuencia	Cebador Inverso	Secuencia
<b>Cadena Pesada</b>			
NMC-VH-EcoRI-F	5'-GACGCGAATTCGCAGGTGCAG CTGAAGGAGAGC -3' (SEQ ID NO: 34)	NMC-VH-IgG1-R	5'-CGGATGGGCCCTTGGTGGAAAG CGCTGCTCAGGGTCACGCTGGT -3' (SEQ ID NO: 35)
hIgG-F	5'-GCTTCCACCAAGGGCC CATCCG -3' (SEQ ID NO: 36)	hIgG-R	5'-CCAGAGACAGGGAGAGGC TCTTCTG -3' (SEQ ID NO: 37)
		IgG1-BamHI-R	5'-ATTAGGATCCTTATCATTTACC CAGAGACAGGGAGAGGCT -3'
hFc-L235E-F	5'-CTCGAGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTT -3' (SEQ ID NO: 39)	hFc-L235E-R	5'-AAGAGGAAGACTGACGGTCCCC CTCGAG -3' (SEQ ID NO: 40)
CH2-C1q(-)-F	5'-GGCGTACGCGTGCGCGGTCT CCAACAAAGC -3' (SEQ ID NO: 41)	CH2-C1q(-)-R	5'-CCGCGCACGCGTACGCTTGC CATTAGCCA-3' (SEQ ID NO: 42)
4-59 conductora-HindIII-NMC-4	5'-ATTAAGCTTGCCGCCACCATGAAA CATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTG GCAGCTCCAGGTGGTCTGTCCCA GGTGCAGCTGAAGGAGAGC -3' (SEQ ID NO: 43)	IgG1-BamHI-R	5'- TAAGGATCCTTATCATTTAC CCGGAGACAGGGAGAG-3' (SEQ ID NO: 44)

Cadena Ligera			
NMC-VL-EcoRI-F	5'-GACGCGAATTCGGACATCCA GATGACCCAGAGCC -3' (SEQ ID NO: 45)	NMC-VL-Kappa-R	5'-GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGT TCGCTTACCTCCAGCTTGGTGCC -3' (SEQ ID NO: 46)
Kappa-F	5'-CGAACTGTGGCTGCACCAT CTGTCTT -3'	Kappa-BamHI-R	5'-AATTCGGATCCTTACTAACACT CTCCCCTGTTGAAGCTCTT -3' (SEQ ID NO: 48)

En un método ilustrativo, pueden llevarse a cabo reacciones PCR utilizando el KIT PFX DNA POLYMERASE de Accuprime (Invitrogen). Por ejemplo, se ensambla una mezcla de reacción de 50 µl que incluye: 1xPFX tampón, 0,2 µm de mezcla dNTP, 1 unidad de PFX polimerasa, 1 µM de cebador directo, 1 µM de cebador inverso y 100 ng de modelo(s) de DNA. Un programa PCR estándar consiste en la desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos, teniendo cada ciclo 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 68°C durante 1 minuto y un paso de extensión final a 68°C durante 10 minutos. Los productos PCR se purifican por electroforesis en gel de garosa sobre un gel de 0,8% TAE y una o más bandas del tamaño deseado se escinden y se purifican con un KIT de EXTRACCIÓN de GEL Qiagen. Los fragmentos de DNA se ligan durante 30 minutos a la temperatura ambiente en un volumen de 10 µl que incluye 1xtampón de ligasa T4-DNA (NEB), 0,5 µl de NDA-ligasa T4 (NEB) y 100 ng de cada DNA. A continuación, se utiliza 1 µl de la reacción de ligación para transformar células *E. coli* JM109 y los insertos generados por la PCR se comprueban por secuenciación utilizando un Analizador de DNA Beckman CEQ 8000.

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

Opcionalmente, se introducen sustituciones (v.g., mutaciones) de aminoácidos en la región Fc de IgG1 para anular la Fc y complementar los sitios de fijación para eliminar la citotoxicidad que se supone está mediada por la región constante Fc de tipo salvaje γ1 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 143). Por ejemplo, una región constante de IgG1 humana (v.g., Fc) derivada del clon de cDNA I.M.A.G.E. #4764579 (ATCC) (SEQ ID NO: 33), se amplifica utilizando los cebadores hlgG-F (SEQ ID NO: 36) y hlgG-R (SEQ ID NO: 37) (Tabla 1). Las sustituciones de aminoácidos (v.g. L235E (el sitio de fijación de FcR), y E318A, K320A, K332A (en el sitio de fijación del complemento C1q)) se introducen en la región Fc de IgG1 realizando, por ejemplo, mutagénesis orientada (Duncan y Winter; Nature, 332 (6166): 738-40 (1988)). Por ejemplo, la mutación L235E se introduce en la región constante utilizando el par de cebadores hFc-L235E-F (SEQ ID NO: 39) y hFc-L235E-R 46 (SEQ ID NO: 40); y las mutaciones del sitio de complemento se introducen utilizando el par de cebadores CH2-C1q(-)-F (SEQ ID NO: 41) y CH2-C1q(-)-R (SEQ ID NO: 42) (Tabla 1). Los productos PCR resultantes que comprenden las cuatro mutaciones se enlazan utilizando dos cebadores externos, hlgG-F (SEQ ID NO: 36) e IgG1-BamHI-R (SEQ ID NO: 38) para obtener un producto PCR que codifica una región Fc de IgG1 modificada (denominada IgG1 (dm)).

En un método ilustrativo, la región variable de la cadena pesada de NMC-4 se fusiona a una región Fc de IgG1 modificada (v.g. IgG1(dm)) por métodos recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada de NMC-4 (SEQ ID NO: 1) se amplifica con los cebadores NMC-VH-EcoRI-F (SEQ ID NO: 34) y NMC-VH-IgG1-R (SEQ ID NO: 35) que introducen un sitio de clonación *EcoRI* aguas arriba del término N de NMC-VH. Resumidamente, el producto PCR se enlaza con una región constante de cadena pesada (v.g., IgG1(dm)), por PCR recombinante en dos pasos, utilizando primeramente el par de cebadores NMC-VH-EcoRI-F (SEQ ID NO: 34) e hlgG-R (SEQ ID NO: 37) seguido por una reacción PCR que utiliza el par de cebadores NMC-VH-EcoRI-F (SEQ ID NO: 34) e IgG1-BamHI-R (SEQ ID NO: 38). El producto PCR final se digiere con *EcoRI* y *BamHI* y se somete a clonación en los sitios *EcoRI* y *BamHI* del vector pIRES2-EGFP-Igk (Clontech, Palo Alto, California), que está modificado para comprender una secuencia conductora de Igk (METDTLLLWVLLWVPGSTGD) (SEQ ID NO: 107) codificada por el polinucleótido de SEQ ID NO: 140) clonado en los sitios *XhoI* y *EcoRI*.

En un método ilustrativo, la región variable de la cadena ligera de NMC-4 se fusiona a una región Fc de IgG1 modificada (v.g., IgG1(dm)) por técnicas recombinantes como se describe más adelante. Por ejemplo, la región constante de cadena ligera Igk (v.g., κC1 (SEQ ID NO: 141) se amplifica a partir del DNA producido a partir del clon I.M.A.G.E. #4704496 (ATCC (SEQ ID NO: 108) utilizando cebadores, Kappa-F (SEQ ID NO: 47) y Kappa-BamHI-R (SEQ ID NO: 48), lo que induce ulteriormente un sitio de restricción *BamHI* en el extremo 3' de la región constante de la cadena ligera de Igk. Análogamente, la región variable de la cadena ligera se amplifica a partir del gen VL sintetizado con los cebadores NMR-VL-EcoRI-F (SEQ ID NO: 45) y NMC-VL-Kappa-R (SEQ ID NO: 46) (Tabla 1) lo que introduce un sitio *EcoRI* en el extremo 5'. A continuación, la región variable NMC-4 y fragmentos de κC1 se enlazan por PCR recombinante utilizando cebadores NMC-VL-EcoRI-F (SEQ ID NO: 45) y Kappa-BamHI-R (SEQ ID

NO: 48). El producto PCR final se digiere con *EcoRI* y *BamHI* y se clona en el vector pIRES-DsRed2-Igk en los mismos sitios.

El nivel de expresión de la cadena pesada en el vector pIRES2EGFP puede ser bajo en comparación con el plásmido pIRES-DsRed que expresa la quimera de cadena ligera ratón-humana, a pesar del hecho de que se utiliza la misma secuencia conductora Igk para ambas cadenas ligera y pesada. De acuerdo con ello, a fin de mejorar el nivel de expresión de la cadena pesada, la secuencia Igk conductora se reemplaza por la secuencia conductora de la línea germinal humana 4-59 VH (MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS) (SEQ ID NO: 109) utilizando el par de cebadores conductora 4-59 *HindIII*-NMC-4 (SEQ ID NO: 43) e IgG1-BamHI-R (SEQ ID NO: 38) con el vector pIRES2-EGFP-NMC-4-IgG (mut) que sirve como el modelo (Tabla 1). El fragmento se digiere con *HindIII* y *PmeI* y se subclona en los sitios *HindIII* y *PmeI* del vector pcDNA6-cMyc-A (Invitrogen, Carlsbad, CA).

**Construcción de un Anticuerpo de Referencia AJW200.** AJW200 es otro anticuerpo dirigido contra el dominio A1 de vWF, con capacidad para bloquear la interacción del dominio A1 de vWF con GPIIb $\alpha$ . Se genera un anticuerpo AJW200 de referencia por modificación mediante ingeniería de la secuencias VH y VL descritas en la Patente U.S. No 6.228.360 para comprender, por ejemplo, una secuencia Kozak funcional adicional para expresión mejorada. Por ejemplo, el gen VH sintético de AJW200 se amplifica utilizando los cebadores *HindIII*-Ko-AJW-F (SEQ ID NO: 49) y HuFab-H-R (SEQ ID NO: 50) (Tabla 2) y se clona en el sitio *HindIII* y *Apal* del vector pcDNA6-cMyc-A digerido con *HindIII*-*Apal* que comprende la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (dm) (reemplazando por tanto la VH de NMC-4). La VL de AJW200 se amplifica utilizando el par de cebadores *XhoI*-Ko-AJW-F (SEQ ID NO: 51) y *Kappa*-BamHI-R (SEQ ID NO: 48) y se subclona en los sitios *XhoI* y *BamHI* del vector pIRES-DsRed portador de la quimera de cadena ligera NMC (reemplazando con ello la VL de la NMC-4).

**Tabla 2. Cebadores Utilizados para Generar los Plásmidos de Expresión AJV200**

Cebador Directo	Secuencia	Cebador Inverso	Secuencia
Hind III-Ko-AJW-F	5'-GTTAAGCTTGCCGCCACCATGGA TTTTGGGCTGATTTTTTTTATTGTT -3' (SEQ ID NO: 49)	HuFab-H-R	5'- GAATGGGCCCTTGGTGGGAAGCGG AGGAAACGGTCACGAGGGTA -3' (SEQ ID NO: 50)
XhoI-Ko-AJW-F	5'-AATCTCGAGGCCGCCACCATGA GTGTGCCCACTCAGGTCCTGG -3' (SEQ ID NO: 51)	Kappa-BamHI-R	5'- AATTCGGATCCTTACTAACACT CTCCCTGTTGAAGCTCTT -3' (SEQ ID NO: 48)

**Producción de anticuerpos:** Pueden producirse anticuerpos quiméricos por cualesquiera métodos conocidos en la técnica. En un método ilustrativo, se cultivan células HEK293F en medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen) en matraces de sacudidas a 120 rpm, 37°C, 8% CO<sub>2</sub>. Las células se reducen a un sedimento a 100xg, se resuspenden en 30 ml de MEDIO DE EXPRESIÓN FREESTYLE 293, y se agitan vorticialmente durante 20 segundos para alcanzar una suspensión de células simples. Las células se someten a recuento y se siembra un matraz de sacudidas de 2 l con 3,3x10<sup>8</sup> células en un volumen total de 330 ml de MEDIO FREESTYLE 293. La mezcla de transfección se compone de partes iguales de DNA/OptiMEM (v.g., 165  $\mu$ g de plásmido de expresión HC, 165  $\mu$ g de plásmido de expresión LC, y OptiMEM (Invitrogen) a la temperatura ambiente hasta un volumen total de 11 ml) y 293fectin/OptiMEM (v.g., 433  $\mu$ l de 293fectin (Invitrogen) y OptiMEM (Invitrogen) a la temperatura ambiente hasta un volumen total de 11 ml). La mezcla de DNA se añade a la mezcla de 293fectin, se mezcla luego y se incuba durante 20 minutos a la temperatura ambiente, después de lo cual se añade al medio existente que contiene las células 293F. Las células se incuban a 37°C, 8% CO<sub>2</sub> con sacudidas a 120 rpm. Al cabo de 72 horas después de la transfección, la suspensión se centrifuga durante 5 minutos a 100xg para reducción de las células a un sedimento y el sobrenadante que contiene Mab se filtra a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m y se purifica utilizando una columna de afinidad de Proteína-A.

Volúmenes pequeños de medio acondicionado (CM) de células HEK-293F transfectadas transitoriamente se aplican a una columna de goteo con 0,3 ml de Proteína A SEPHAROSE que se ha equilibrado con PBS. La columna se lava con 10 ml de PBS y las proteínas se eluyen con glicina 0,1 M, pH 2,7. Se recogen fracciones de 1 mililitro en 0,1 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, eluyéndose la mayor parte del anticuerpo en las dos primeras fracciones de eluato. Estas dos fracciones se agrupan y se concentran a un volumen final (v.g. 0,2-0,3 ml) utilizando, por ejemplo, un dispositivo centrífugo Vivaspin de 0,5 ml. Durante este paso de concentración, se realizan diluciones intermedias con PBS para intercambiar el tampón de Tris-glicina a PBS. El concentrado final se esteriliza por filtración a través, por ejemplo, de un filtro de jeringuilla de 0,2  $\mu$ m y la concentración de proteínas de la muestra que contiene el anticuerpo se determina utilizando un ensayo de proteínas Lowry (BioRad DC Protein Assay).

Para purificación en gran escala, se concentran 2 litros de medio acondicionado (CM) procedente de células adherentes transfectadas transitoriamente (v.g. HEK-293T) por ultrafiltración en un cartucho de fibra hueca (v.g., Amersham Biosciences 30.000 NMWC/290 cm<sup>2</sup>, columna de fibra hueca USP-30-C-3X2MA) hasta que el volumen

se reduce a ~ 200 ml. Este material concentrado o, para transfecciones más pequeñas, CM simple se bombea a una columna de 12 ml de Proteína A SEPHAROSE que se ha equilibrado con Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. La columna se lava con Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, hasta que la lectura UV<sub>280</sub> ha establecido una línea base. El anticuerpo se eluye con glicina 0,1 M, pH 2,7 y se recogen fracciones de 3 ml. El pH de las fracciones que contienen la proteína pico se ajusta por adición de Tris-HCl de pH 8,0 a una concentración final de 0,1 M. Las fracciones pico se agrupan, se concentran a un volumen inferior a 7 ml por ultrafiltración (v.g., en un dispositivo de centrifugación Amicon Ultra de 15 ml), y se desalan luego en PBS utilizando dos operaciones separadas en una columna PD-10 (Amersham Biosciences/GE-Healthcare).

Las proteínas obtenidas de los sobrenadantes de cultivo se cuantifican y analizan por cualquier método conocido en la técnica (v.g., el ensayo de proteínas Lowry (BioRad DC Protein Assay). En un método ilustrativo, se analizan sobrenadantes de cultivo por SDS-PAGE. Resumidamente, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, se bloquean con 5% leche/PBS durante 1 hora a la temperatura ambiente, y se incuban con IgG anti-humana de ratón conjugada con HRP (v.g., específica de cadena  $\gamma$ , 1:10.000) y kappa antihumana de ratón (v.g., específica de cadena kappa, 1:1000) (Southern Biotech, Cat #9042-05 y #9220-05, Birmingham, AL) y las señales se detectan con un kit ECL.

**Actividad inhibidora en vitro en el ensayo de aglutinación de las plaquetas inducida por ristocetina:** En un método ilustrativo, se ensayan anticuerpos Fc humanos NMC-4 quiméricos respecto a actividad, incluyendo por ejemplo, la fijación específica para vWF. Por ejemplo, se realizan ensayos de aglutinación de plaquetas con un agregómetro estándar (Bio/Data, modelo PAP-4) utilizando plaquetas humanas liofilizadas (Bio/Data, Horsham, PA). Resumidamente, se añaden 50  $\mu$ l de ristocetina (v.g., concentración stock = 15 mg/ml) (Bio/Data) y 48,5  $\mu$ l de TBS o anticuerpo de test a un tubo que contiene  $1 \times 10^8$  plaquetas liofilizadas en un volumen de 400  $\mu$ l. La lectura de la línea base se registra durante 10 segundos antes de añadir 1,5  $\mu$ l de vWF purificado (v.g., concentración final de 1,5  $\mu$ g/ml) al tubo para iniciar la aglutinación. El valor CE<sub>50</sub> del anticuerpo de test se estima como la concentración que inhibe el 50% de la aglutinación plaquetaria. En una comparación con el anticuerpo monoclonal paterno, la quimera demostró una potencia equivalente a la del anticuerpo NMC4 paterno de murino.

Adicionalmente, para determinar más exactamente los valores CE<sub>50</sub>, se ensayan anticuerpos quiméricos utilizando, por ejemplo, un método de lector de placas adaptado del método de microplacas. En un método ilustrativo, se añaden  $4,5 \times 10^7$  plaquetas fijadas con paraformaldehído en 150  $\mu$ l de TBS (pH 7,5) por pocillo utilizando una placa COSTAR 3603 de 96 pocillos y se añade vWF humano purificado (Calbiochem, San Diego, CA) a una concentración final de 1,5  $\mu$ g/ml por pocillo. Se añaden concentraciones seriadas de anticuerpos de test seguido por la adición de ristocetina a una concentración final de 1,5  $\mu$ g/ml por pocillo para iniciar la aglutinación y se monitoriza la turbidez (v.g., absorbancia a 405 nm) utilizando un Lector de Placas SPECTRAMAX PLUS (Molecular Devices) ajustado a 37°C durante 6 minutos con 20 segundos de agitación in situ entre los ciclos de lectura. Se añade el compuesto inhibidor (v.g., 20  $\mu$ l/pocillo) o el MAb de referencia (v.g., AVW-3) y las mezclas se incuban y se monitorizan durante 2 minutos. Finalmente, se añade ristocetina o botrocetina (20  $\mu$ l/pocillo) y las mezclas se incuban y se monitorizan durante 40 minutos. La señal de aglutinación se monitoriza como la magnitud de la disminución de absorbancia (v.g.,  $-\Delta$  absorbancia).

La quimera Fc NMC-4-humanoa se compara con el anticuerpo monoclonal NMC-4 original y con el anticuerpo AJW200 clonado. Como se muestra en la Figura 1, la quimera NMC-4 es similar en actividad al mAb NMC-4 original y ligeramente más potente que AJW200 en el seno de aglutinación de las plaquetas inducido por ristocetina, con valores CE<sub>50</sub> de 0,1, 0,17 y 0,27 nM, respectivamente.

## Ejemplo 2: Construcción de Anticuerpos Humanizados

**Selección de marcos aceptores humanos:** Bases de datos (v.g., una base de datos de línea germinal humana, base V, o la base de datos Kabat) o publicaciones (v.g., Kabat *et al.*, Secuencias of Proteins of Immunological Interest, 1992) pueden utilizarse para identificar las subfamilias a las que pertenecen las regiones V de cadena pesada y ligera murinas, y determinar el marco de línea germinal humana más adecuado para utilización como molécula aceptora. La selección de las secuencias VH y VL que pueden utilizarse dentro de estas subfamilias como secuencias aceptoras puede basarse en homología de secuencia y/o en un apareamiento de la estructura canónica de las regiones CDR1 y CDR2 para ayudar a preservar la presentación relativa apropiada de las 6 CDRs después de injerto.

Por ejemplo, el uso de la base V indica que la cadena ligera  $\kappa$  de NMC-4 es de la subfamilia kappa 1, dado que se identifica una buena homología entre el marco VL de NMC-4 y los miembros de la subfamilia  $\kappa$  1 (VK1). La homología máxima y la preservación óptima de las estructuras canónicas de los bucles CDR se observa para la secuencia 018 de la línea germinal (SEQ ID NO: 5), que tienen una identidad de secuencia de 78% para la secuencia entera hasta CDR3 y una identidad de secuencia de 84% para las regiones marco. La alineación de la cadena ligera de NMC-4 y la cadena ligera humana 018 (SEQ ID NO: 5) y AAK94808 (un anticuerpo maduro derivado de 018, utilizado para proporcionar una LCDR3 y secuencia marco 4 para comparación con NMC-4 en esta región) (SEQ ID NO: 6) se muestra en la Tabla 3, indicándose las diferencias entre la NMC y el anticuerpo humano como letras en negrita (con numeración basada en el esquema de numeración de Kabat (Kabat, 1978)).

Análogamente, el uso de la base V indica que la secuencia VH hasta el marco 3 cae dentro de la subfamilia IV de VH. Dentro de la subfamilia IV de VH humana, la VH de NMC-4 muestra la homología máxima de secuencia con la secuencia de la línea germinal 4-59 (SEQ ID NO: 3) que exhibe una identidad de secuencia de 56% con la VH murina para la VH entera hasta CDR3, y 67% de identidad para las regiones marco solas (Tabla 4). Sin quedar ligados por una teoría de la descripción, se selecciona AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) para proporcionar una secuencia comparadora de HCDR3 y el marco 4 dado que comparte secuencias de aminoácidos idénticas en los marcos 1 a 3 y HCDR1 y HCDR2 con VH 4-59 de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 3). HCDR3 y las 4 regiones marco no se incluyen en las secuencias de la línea germinal VH en la base de datos V base, dado que las regiones HCDR3 son sumamente divergentes y FW4 es un dominio distinto derivado de un producto génico separado (J). Las diferencias de aminoácidos entre la VH de NMC-4 y las secuencias AAC18165.1 (SEQ ID NO: 4) están resaltadas en negrita y sus posiciones por los asteriscos en la Tabla 4.

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

Nombre	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	-----1-----*-----2-*	*-----3*-----	-----4**-----*	5*-----*
Kabat No:	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
NMC-4 VL (SEQ ID NO: 2)	DIQMTQSPSSLSASLGRVTIS	SASQDINKYLN	WYQKPDGAVKLLIF	YTSSLHS
018 (AAK94808) (SEQ ID NO: 6)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQDISNYLN	WYQKPKGKAPKLLIY	DASNLET
Nombre	FW3	CDR3	FW4	
	-----6-----7***-----*-----8-----	-----9-----*		
Kabat No:	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567	
NMC-4 VL	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYEKLPWT	FGGGTKLEVK	
018 (AAK94808)	GVPSRFSGSGSGTDFITISLQPEDIAITYYC	QQYDNLPLT	FGGGTKVEIK	

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

Nombre	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	-----*-----1-----*-----*-----*-----3*-----*-----4-----*-----5-----*-----6*-----			
Kabat No:	123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345			
NMC-4 VH (SEQ ID NO: 1)	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTICTVS	GFSLTDYGV	WVRQPPGKGLEWLG	MIWGDGSTDYNSALKS
4-59 (AAC18165.1) (SEQ ID NO: 4)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLICTVS	GGSSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYNPSLKS
Nombre	FW3	CDR3	FW4	
	-----7*-----*-----8-----*-----9-----	-----10*-----	-----11-----	
Kabat No:	67890123456789012345678901234	567890abcdef12	34567890123	
NMC-4 VH	RLSITKDNKSKQVFLKMNLSLQDDTARYYCVR	DPADYGNIDYALDY	WGQGTSTVTVSS	
4-59 (AAC18165.1)	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	GYRPGVAHSPFDY	WGQGTSLVTVSS	

Dado que se supone que el injerto directo de CDRs de un anticuerpo de ratón a marcos de anticuerpo humano da como resultado pérdida de afinidad para la fijación de antígeno (Foote y Winter J. Mol. Biol. 224: 487-499 (1992); Xiang *et al.* J Mol Biol. 253:385-90 (1995); Homes *et al.* J. Immunol. 167:296-301 (2001)), puede ser deseable mutar de nuevo ciertos residuos en los marcos a los residuos de ratón en dichas posiciones, un proceso denominado retromutación. Por ejemplo, la Tabla 5 muestra los residuos que pueden afectar a las conformaciones de CDRs y que pueden ser candidatos potenciales para retromutación al residuo murino (v.g., las diferencias de aminoácidos entre la NMC-4 y los marcos humanos en estas posiciones se han resaltado en letras negritas cursivas).

**Tabla 5. Residuos marco que afectan a la confirmación de las CDRs; comparación de NMC-4 y las regiones variables de aceptores humanos**

VL			VH		
Posición Kabat	NMC-4	O18 FW	Posición Kabat	NMC-4	4-5 FW
2	I	I	2	V	V
4	M	M	47-49	W, L, G	W, I, G
35-36	W, Y	W, Y	67	L	V
46-49	L, L, I, F	L, L, I, Y	69	I	I
64	G	G	71	K	V
66	G	G	73	N	T
68-69	G, T	G, T	78	V	F
71	Y	F	93-94	V, R	A, R
98	F	F	103	W	W

5 Los residuos de aminoácidos que pueden estar implicados en el apareamiento de las cadenas pesada y ligera para coordinar la presentación de CDRs han sido identificados (Holmes *et al.*, J. Immunol. 167: 296-301 (2001)) y pueden ser candidatos para retromutación. Sin quedar ligados por una teoría de la descripción, dentro de la región VL, se consideran importantes los residuos 44, 96 y 98, con contribuciones adicionales de los residuos 34, 36, 38, 46, 87, 89 y 91. De estos residuos, el único que difiere acusadamente entre NMC-4 y el aceptor 018 para la región VL es el residuo 44, que es una valina en NMC-4 VL y una prolina en el marco humano 018. Sin quedar ligados por una teoría de la descripción, para la VH, son importantes los residuos 45 y 103, contribuyendo también los residuos 35, 10 37, 39, 47, 91, 93 y 95 al empaquetamiento de la interfaz de la VH con la VL. Las únicas diferencias en estos residuos de interfaz para NMC-4 VH y los marcos aceptores 4-59 se encuentran en el residuo 93, en el que existe una diferencia conservadora de una valina en NMC-4 comparada con alanina en 4-59 (Tabla 5).

15 La comparación de las secuencias marco de la secuencia murina y la secuencia VH 4-59 de la línea germinal humana revela que muchas de las diferencias en los residuos que se suponen importantes para la presentación de CDR y el empaquetamiento de interfaz están agrupadas en el marco 3 (residuos 67, 71, 73, 78, 93), con diferencias adicionales en los residuos 37 y 48 en el marco 2. Estos residuos son candidatos supuestos para retromutación en la secuencia humanizada prototipo. Sin embargo, las diferencias para los dos residuos marco 2 (37V frente a 371 y 48L frente a 481) son conservadoras; por tanto la primera secuencia VH prototipo puede enfocarse en las 20 diferencias en la región marco 3 y llevar las retromutaciones siguientes de humano a ratón: V67L, V71K, T73N, F78V y A93V (Tabla 6). El gen sintético es sintetizado habitualmente por Retrogen (San Diego, CA) y designado H2, y está clonado en los sitios *Nhe1* y *Xho1* del vector bacteriano pRSFDuet (Novagen, Madison, WI) y utilizado como modelo para amplificar la inserción utilizando los cebadores 4-59-huNMC-F (SEQ ID NO: 54) y hu-VH-R (SEQ ID NO: 55) (Tablas 7 y 9). El fragmento resultante se digiere con *Apa1*. El plásmido pcDNA6-NMC-HC, que contiene la 25 cadena pesada quimérica de NMC-4 generada en el Ejemplo 1, se digiere con *HindIII* y *Apa1* y el fragmento de DNA que contiene el fragmento pcDNA-IgG1dm se termina en extremos romos con fragmento Klenow en presencia de NTPs. El producto PCR que contiene el VH se ligera al fragmento de extremos romos pcDNA-IgG1dm. El DNA plasmídico se utiliza luego para transformar la cepa hospedadora *E. coli*, JM109. Los clones individuales se secuencian utilizando un secuenciador de DNA Beckman CEQ 8000 para identificar un clon que expresa la inserción en la orientación correcta y con la secuencia correcta (clon pcDNA-huVH-IgG1dm). Este vector se utiliza como 30 modelo para las variantes H4, H5, H6, H7 y H8 que están diseñadas para evaluar el efecto de invertir individualmente cada residuo al residuo humano (resumido en la Tabla 6). Estas variantes se construyen utilizando los pares de cebadores indicados en la Tabla 7 (las secuencias correspondientes se muestran en la Tabla 9).

**Tabla 6.** Mutaciones de residuos marco incorporadas en las secuenciasceptoras de la línea germinal 4-59 y 018 para las diferentes variantes de VL y VH.

VH	Retromutaciones (Humana a Murina)	VL	Retromutaciones (Humana a Murina)	(Humana a humana común)
H2	V67L, V71K, T73N, F78V, A93V	L5	P44V, Y49F, F71Y	F73L, G100Q
H4	V67L, V71K, T73N, F78V	L4	Y49F, F71Y	F73L, G100Q
H5	V71K, T73N, F78V, A93V	L6	P44V, F71Y	F73L, G100Q
H6	V67L, T73N, F78V, A93V	L7	P44V, Y49F	F73L, G100Q
H7	V67L, V71K, F78V, A93V	L8	Sin retromutaciones	F73L, G100Q
H8	V67L, V71K, T73N, A93V	L9	Sin retromutaciones	F73L, I83F, G100Q
H9	Sin retromutaciones			

**Tabla 7.** Sumario de modelos y cebadores utilizados para construir las variantes humanizadas de cadena pesada.

Variantes de VH	Modelo	Cebadores PCR del Fragmento 1	Cebadores PCR del Fragmento 2	Cebadores PCR de VH Finales	Vector	Sitios de clonación
H2	DNA Sintetizado de Retrogen			4-59-huNMC-F y hu-VH-R	pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H4	H2 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F y VH-V93A-Rev	VH-V93A-For y hFc-L235E-R	pcDNA6-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H5	H2 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F y HC-L67V-R	HC-L67V-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H6	H2 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F y HC-K71V-R	HC-K71V-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H7	H2 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F y HC-N73T-R	HC-N73T-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H8	H2 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F y HC-V78F-R	HC-V78F-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-F y hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H9	DNA Sintetizado de Retrogen			4-59-huNMC-F y hu-VH-R	pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal

5

Se supuso que la comparación de residuos afectaba la estructura canónica, y el empaquetamiento de la interfaz indica que existen tres diferencias entre la NMC-4 VL y el marco aceptor VL humano 018 (v.g., residuos 44, 49 y 71). Por tanto, puede diseñarse una variante humanizada prototipo, L5, que lleva 3 retromutaciones en el residuo murino (v.g., P44V, Y49F y F71Y) (Tabla 6). Adicionalmente, esta variante está diseñada de modo que tiene el residuo 73 cambiado de fenilalanina a leucina, dado que la leucina es un residuo más común en esta posición en el repertorio de anticuerpos humanos. Para generar esta variante, una variante designada VL4, que lleva cambios de marco (v.g., Y49F, F71Y y F73V), se sintetiza habitualmente (Retrogen) y se clona en el vector pETDuet utilizando los pares de cebadores indicados en la Tabla 8. El vector L4-pETDuet resultante se utiliza como modelo para introducir la mutación p44V de L5 utilizando los pares de cebadores enumerados en la Tabla 8. La variante L5 se somete luego a subclonación en los sitios *EcoR1* y *BamH1* del vector pIRES DsRed2 en lugar del NMC-4 VL murino. El vector L5-pIRES DsRed se utiliza luego como modelo para generar los vectores L6 y L7 utilizando los cebadores indicados en la Tabla 8.

10

15

**Tabla 8.** Sumario de modelos y cebadores utilizados para construir las variantes de cadena ligera humanizadas

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

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

Cebador Directo	Secuencia	Cebador Inverso	Secuencia
4-59-huNMC-F	5'- GTTAAGCTTGCCGCCACCATGAA ACATCTGTGGTTCTTCTCTCTCTGGT GGCAGCTCCCAGGTGGTCTGTCCC AGGTGCAGCTGCAGGAATCCGG-3' (SEQ ID NO: 54)	Hu-VH-R	5'-GGATGGGCCCTTGGTGGGAAGC GGAGGAAACGGTACAGGAGGTA-3' (SEQ ID NO: 55)
pcDNA6-F	5'- CACTGCTTACTGGCTTATCG AAATTA-3' (SEQ ID NO: 56)	hFc-L235E-R	5'-AAGAGGAAGACTGACGGTCCCCC CTCGAG -3' (SEQ ID NO: 40)
VH-93A-For	5'-GACACCCTGTTTACTACT GCGCTCGTGACCCGGCTGACT -3' (SEQ ID NO: 57)	VH-V93A-Rev	5'-AGTCAGCCGGTACAGACCGCA GTAGTAAACAGCGGTGTC -3' (SEQ ID NO: 58)
HC-L67V-F	5'-CTGAAATCCCGTGTTACCATC TCCAAAGAC -3' (SEQ ID NO: 59)	HC-L67V-R	5'-GTCCTTTGGAGATGGTAACACGGG ATTTACAG -3' (SEQ ID NO: 60)
HC-N73T-F	5'-ACCATCTCCTCAAAGACACCTCC AAAAAC -3' (SEQ ID NO: 61)	HC-N73T-R	5'-GTTTTTGGAGGTGCTTTGGA GATGGT -3' (SEQ ID NO: 62)
HC-V78F-F	5'-AACTCCAAAAACAGTTCT CCCTGAAAC -3' (SEQ ID NO: 63)	HC-V78F-R	5'-GTTTCAGGGGAGAACTGGTTTTT GGAGTT -3' (SEQ ID NO: 64)
HC-K71V-F	5'-CTTACCATCTCCGTAGACAA CTCCAAAAAC -3' (SEQ ID NO: 65)	HC-K71V-R	5'-GTTTTTGGAGTTGTCTACGGA GATGGTAAG -3' (SEQ ID NO: 66)

hu-VH-K71V-F (H9)	5'-CGTGTACCATCTCCGTAGA CACCTCCAAA -3' (SEQ ID NO: 67)	hu-VH-K71V-R (H9)	5'-TTGGAGGTGTCTACGGAGAT GGTAACACG -3' (SEQ ID NO: 68)
Fab-L-For	5'- ATACATATGGACATCCAGATG ACCCAGAGC -3' (SEQ ID NO: 69)	Fab-L-Rev	5'- AGACTCGAGTTATCAAACTCTCC CCTGTTGAAGCT -3' (SEQ ID NO: 70)
NMC4-VL-EcoRI-F	5'-GACGCGAATTCGGACATCCA GATGACCCAGAGCC -3' (SEQ ID NO: 71)	Fab-L-Rev	5'- AGACTCGAGTTATCAAACTCTCC CCTGTTGAAGCT -3' (SEQ ID NO: 70)
5'-IRES	5'-AGCTGGTTTAGTGA -3' (SEQ ID NO: 72)	3'-IRES	5'-CAAGCGGCTTCGGCCAG -3' (SEQ ID NO: 73)
LC-Y49F-F	5'-CCAAGCTGCTGATCTTCTAC ACCA -3' (SEQ ID NO: 74)	LC-Y49F-R	5'-TGGTGTAGAAGATCAGCAG CTTGG -3' (SEQ ID NO: 75)
LC-F83I-F	5'-CAGCCCCGAGGACATCGCCAC CTACTACTGC -3' (SEQ ID NO: 76)	LC-F83I-R	5'-GCAGTAGTAGGTGGCGATGCTCT CGGGCTG -3' (SEQ ID NO: 77)
LC-P44V-F	5'-AAGCCCGGCAAGGCCGTC AAGCTGCTGATC -3' (SEQ ID NO: 78)	LC-P44V-R	5'-GATCAGCAGCTTGACGGCCTTGC CGGGCTT -3' (SEQ ID NO: 79)
LC-F49Y-F	5'-GCCGTCAAGCTGCTGATCTA CTACACCAG -3' (SEQ ID NO: 80)	LC-F49Y-R	5'-CTGGTGTAGTAGATCAGCAGCT TGACGGC -3' (SEQ ID NO: 81)
LC-Y71F-F	5'-GGCAGCGGCACCGACTTCA CCCTGACCATC -3' (SEQ ID NO: 82)	LC-Y71F-R	5'-GATGGTCAGGGTGAAGTCGGTG CCGCTGCC -3' (SEQ ID NO: 83)
HuLC-V44P, F49Y-F	5'-GGCAAGGCCCCCAAGCTGCT GATCTACTACACCAG -3' (SEQ ID NO: 84)	HuLC-V44P, F49Y-R	5'-CTGGTGTAGTAGATCAGCAGC TTGGGGCCTTGCC -3' (SEQ ID NO: 85)

5 En paralelo con la clonación de estos primeros conjuntos de variantes, un modelo tridimensional generado por computadora de la secuencia de la línea germinal aceptora 4-59 se genera utilizando la estructura 1DNO.pdb (v.g., con resolución de 2,3 Å (Angstrom)) identificada en una búsqueda BLAST por tener la identidad de secuencia máxima (88%) para la secuencia entera hasta HCDR3 y una identidad de secuencia de 89% para las regiones marco. La estructura 1AOK.pdb se selecciona como el modelo para la secuencia humanizada VH con una identidad de secuencia de 81%. Están disponibles dos estructuras cristalográficas de la NMC-4 Fv murina: 1OAK.pd (v.g., con resolución de 2,2 Å) que tiene un antígeno fijado (Cellikel *et al.*, Nat. Struct. Biol. 5: 189-194 (1988)) y se selecciona también como el ajuste óptimo en el dominio VH para la variante humanizada prototipo, y 1FNS.pdb (resolución de 10 2,0 Å), que tiene un antígeno mutante unido. Tanto 1OAK.pdb como 1 FNS.pdb tienen ángulos de interfaz VH/VL virtualmente idénticos, por lo que se utiliza 1OAK.pdb para superposición de los modelos del aceptor humano y las secuencias VH y VL humanizadas.

15 Cuando las estructuras de cadena principal de NMC-4 VH y 4-59 se superponen, pueden observarse 3 áreas de diferencia. En primer lugar, existen diferencias entre los residuos H27 y H33, que incluyen parte de la HCDR1. Sin quedar ligados por una teoría de la descripción, estos residuos ponen en contacto HCDR2 y HCDR3, los cuales forman parte juntos del sitio de fijación de antígeno. El residuo 34, Val en la NMC-4 VH murina y Trp en la secuencia 4-59, se predice que es potencialmente responsable de la conformación alterada del bucle H27-33 y por tanto un candidato para retromutación. En segundo lugar, existen diferencias entre los residuos H52 y H55, que forman parte del bucle CDR2. El residuo marco 71 (Lys en el ratón, Val en 4-59) se considera que juega posiblemente un papel 20 en esta diferencia y por tanto es candidato para retromutación. Tres residuos adicionales se identifican en la

estructura 4-59 por tener el potencial para impedir la fijación de antígeno. H37, que es un cambio conservador de Ile comparado con Val en el ratón; H73 (que representaba un cambio moderado Thr en

4-59 comparado con Asp en el ratón) y H78, que representaba un cambio grande (Phe en 4-59 comparado con Val en el ratón). En tercer lugar, existen diferencias en CDR3, donde se espera diversidad.

- 5 Para modelización de la línea germinal 018 y los dominios VL humanizados prototipo, la estructura 11GM.pdb (v.g., resolución de 2,3 Å) tiene una identidad de secuencia excelente (v.g., 95%) con 018, con 4 diferencias en los residuos L34, L45, L47 y L92. La estructura 01BJ1.p (v.g., resolución de 2,4 Å) se selecciona como el modelo para el prototipo humanizado VL, dado que la misma coincide en los residuos 97/107 (v.g., identidad de secuencia de 91%).

- 10 El ajuste satisfactorio de las cadenas principales VL de las estructuras NMC-4 y 018 VL es coherente con la identidad de secuencia. La única diferencia estructural significativa se encuentra en el bucle comprendido por los residuos L39-L45, que ponen en contacto la VH y podrían influir por tanto en el empaquetamiento y a su vez en la forma de la bolsa de fijación. Sin quedar ligados por una teoría de la descripción, el residuo 44 (v.g. Val en el ratón, Pro en 4-59) es probablemente responsable de esta diferencia y es por tanto un candidato probable para retromutación basado en modelización por computadora.

- 15 **Actividad inhibidora en vitro en el ensayo de aglutinación de las plaquetas inducida por ristocetina:** Para ensayar si las predicciones de modelización por computadora podrían predecir exactamente los efectos sobre la actividad, la variante prototipo VH2 se aparea con una variante VL, (v.g., L4, 5, 6 y 7) y el prototipo L5 se combina con una variante VH (v.g., H2, H4, H5, H6, H7 y H8). Las variantes de anticuerpos se producen por transfección transitoria de células HEK293T y se purifican a partir del sobrenadante de cultivo filtrado como se describe para el anticuerpo quimérico NMC-4 en el Ejemplo 1.

- 20 Se realizan los ensayos de aglutinación de plaquetas inducida por ristocetina utilizando plaquetas liofilizadas como se describe en el Ejemplo 1. El cambio en absorbancia (v.g. turbidez) se mide para diluciones seriadas del anticuerpo por duplicado utilizando un lector de placas Spectromax (Molecular Devices) y los datos se analizan utilizando software Prism a fin de detectar los valores  $CE_{50}$  para las diversas variantes de anticuerpos purificadas (véase, v.g., Tabla 9).

- 25 La primera versión del anticuerpo humanizado, constituido por H2 y L5, exhibía una actividad equivalente (v.g.,  $CE_{50}$  de 0,13) a la quimera paterno ((v.g.,  $CE_{50}$  de 0,18 nM) (Tabla 10). Las variantes de cadena pesada con retromutaciones puntuales sucesivas a los residuos marco humanos se ensayaron luego (v.g., variantes H2 hasta H6). Las variantes exhibían actividad muy similar, excepto para la variante L5-H8, que exhibía una  $CE_{50}$  1,5 veces menor (Tabla 9). Es interesante que el rendimiento de esta variante era bajo (v.g., 1/10 de otras variantes), lo que sugiere que la interacción entre la cadenas pesada y ligera humanizadas podría haberse visto afectada desfavorablemente por esta combinación de mutaciones, dado que la estabilidad del anticuerpo depende del ensamblaje correcto de las cadenas pesada y ligera. Análogamente, se generaron y se ensayaron los anticuerpos de la variante L5, y análogamente, ninguno de los cambios de retroceso a los humanos parecía afectar a la actividad, lo que sugería que, sorprendentemente, no era necesario cambio de marco alguno. Estos resultados indicaban que ninguna de las diferencias entre los marcos aceptores y los marcos de la región variable NMC-4 que se preveía serían problemáticas, tenía efecto alguno sobre la potencia, incluyendo las diferencias más acusadas que se creía eran subyacentes a las diferencias estructurales observadas por modificación en computadora, incluyendo las diferencias señalizadas como inductoras de las diferencias de conformación máximas (v.g., V71K y T73N de la VH y P44V de la VL). Dados estos resultados, se construyó una variante de cadena pesada que era portadora de un marco completamente humano (v.g., H9), que representaba una VH simple injertada en CDR. Esta variante se testó luego en combinación con las variantes de cadena ligera así como una variante adicional, L9, que representaba injerto simple de CDR en un marco completamente humano. Sorprendentemente, el anticuerpo injertado directamente en la CDR retenía actividad plena ( $CE_{50}$  de 0,08 nM; Tabla 10). Estos datos demostraban que, inesperadamente, el injerto directo de las CDRs del anticuerpo murino en los marcos humanos seleccionados conservaba la actividad plena del anticuerpo murino original aun cuando los datos cristalográficos publicados indican que CDRs múltiples contribuyen a la fijación de antígeno (Celikel *et al.*, Blood Cells Vol Dis. 23: 123; Celikel *et al.*, Nat. Struct Biol 5:189) y por tanto podía anticiparse que cualquier perturbación en la presentación relativa de las 6 CDRs afectaría a la afinidad.

50

**Tabla 10:** Comparación de los valores  $CE_{50}$  para la quimera NMC-4 paterno comparada con las variantes humanizadas en el ensayo de aglutinación de las plaquetas mediado por vWF inducida por ristocetina

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

5 **Humanización de las regiones CDR:** La modelización molecular sugería que cambios adicionales, diseñados para humanizar CDR1 de la cadena ligera y pesada pueden ser tolerados en L1CDR1 de NMC-4 (v.g., residuos 24, 30 y 31) y H1CDR1 de NMC-4 (v.g. residuos 27, 29, 30 y 34). Adicionalmente, se considera también que dos residuos en la secuencia H1CDR2 (v.g., 61 y 62), representan cambios que pueden ser tolerados (v.g., Ser a Pro para el residuo 61 y Ala a Ser para el residuo 62). Por ello, se han construido una serie de variantes denominadas "superhumanizadas" (Tan *et al.*, 2002 J. Immunol. 169: 1119-1125) a partir de los modelos y pares de cebadores indicados en la Tabla 12 (v.g., L10, que representa la variante con una L1CDR1 enteramente humana; H12 y H13 que representan regiones H1CDR1 parcialmente humanizadas (Tabla 11).

**Tabla 11.** Mutaciones que cambian los residuos CDR murinos a sus contrapartidas 4-59

VH	Super-humanizadas (murino a humano)	VL	Super-humanizadas (murino a humano)
H12	F27G, L29I, T30S	L10	S24Q, N30S, K31N
H13	F27G, L29I, T30S, V34W	L11	S24Q, N30S, K31N, Y50D, T51A, S53N, H55E, S56T
H14	F27G, L29I, T30S, V34W, S61P, A62S		
H15	F27G, L29I, T30S, D3 1 S, G33Y V34W, G35S, S61P, A62S,		
H16	F27G, L29I, T30S, V34W, M50Y, W52Y, G53Y, D54S, D58N S61P, A62S		

15 En un método ilustrativo, las predicciones de modelización por computadora se testan por realización de uno o más ensayos para determinar la actividad del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, la variante L11 se somete a co-transfección con H9, y el anticuerpo se testa en el ensayo de aglutinación de las plaquetas inducida por ristocetina. Como se muestra en la Tabla 14, la introducción de las tres mutaciones para convertir la L1CDR1 enteramente en la de 018 está tolerada y no causaba pérdida significativa alguna de potencia. Cuando las variantes H12, 13 y 14 se combinan con L9, el anticuerpo variante H12-L9 exhibía una pérdida ligera de potencia, pero la mutación V34W adicional restablecía la potencia total y la adición de las mutaciones S61P y A62S tenía poco efecto sobre la potencia, lo que indicaba que estos residuos podrían convertirse en la secuencia 4-59 sin impactar en la actividad. A continuación, se evalúa la importancia de L1CDR2 en el mantenimiento de la actividad de bloqueo de vWF por construcción de una variante de la cadena L10 donde la L1CDR2 entera (**YTSSLHS**) (SEQ ID NO: 11) está reemplazada con la L1CDR2 018 de la línea germinal humana (**DASNL**) (SEQ ID NO: 118) utilizando el plásmido codificante de la variante L10 de VL como modelo y los pares de cebadores indicados en las Tablas 11 y 12. Esta variante recién construida (L11) se aparea luego con H14 para producir la variante de anticuerpo L11-H14. Si bien exhibe todavía potencia nanomolar, esta variante demostraba una actividad 10 veces menor comparada con la

quimera en el ensayo de aglutinación plaquetaria (CE<sub>50</sub> 1,63 mB), lo que sugería que LCDR2 puede ser necesaria para actividad óptima del anticuerpo humanizado.

**Tabla 12.** Sumario del modo en que se construyeron las variantes "super-humanizadas"

Variantes	Modelo	Cebadores PCR del Fragmento 1	PCR	Cebadores PCR del Fragmento 2	PCR	Cebadores PCR de VH Finales	Vector	Sitios de clonación
H12	H9 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F huH12-R	y	huH12-F L235E-R	y hFc-	pcDNA6-F L235E-R	y hFc- pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H13	H9 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F huH13-R	y	huH13-F L235E-R	y hFc-	pcDNA6-F L235E-R	y hFc- pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H14	H13 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F huH14-R	y	huH14-F L235E-R	y hFc-	pcDNA6-F L235E-R	y hFc- pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII-Apal
H15	H14 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F huH15-R	y	huH15-F And L235E-R	hFc-	pcDNA6-F L235E-R	y hFc- pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
H16	H15 en pcDNA6-IgG1(dm)	pcDNA6-F huH16-R	y	huH16-F And L235E-R	hFc-	pcDNA6-F L235E-R	y hFc- pcDNA6-IgG1(dm)	HindIII Apal
L9	L1 en pETDuet-1	NMC4-VL-EcoRI-F y LC-Y71F-R		LC-Y71F-F y Kap- pa-BamHI-R		NMC4-VL-EcoRI-F y Kappa-BamHI-R	pIRES- DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L10	L9 en pIRES-DsRed2-Igk	5'IRES y huL10-R		huL10-F y 3'IRES		5'IRES y 3'IRES	pIRES- DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L11	L10 en pIRES-DsRed2-Igk)	5'-IRES y huL11-R		huL11-F y 3'IRES		5'-IRES y 3'IRES	pIRES- DsRed2-Igk	EcoRI BamHI

5 **Tabla 13.** Cebadores utilizados para construir las variantes CDR humanizadas

Cebador Directo	Secuencia	Cebador Inverso	Secuencia
5'-IRES	5'-AGCTGGTTAGTGA -3' (SEQ ID NO: 72)	3'-IRES	5'-CAAGCGGCTTCGGCCAG -3' (SEQ ID NO: 73)
huL10-F	5'-ACCATCACCTGCCAAGCCAGCCAG GACATCAGCAACTACCTGAACTGG-3' (SEQ ID NO: 86)	huL10-R	5'-CCAGITCAGGTAGTTGCTGATGT CCTGGCTGGCTTGGCAGGTGATGGT -3' (SEQ ID NO: 87)
huL11-F	5'-CCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCA GCAACCTGGAAACCGCGTGCCC -3' (SEQ ID NO: 88)	huL11-R	5'-GGGCACGCCGGTTCCAGGTTGCTGG CGTCGTAGATCAGCAGCTTGGG--3' (SEQ ID NO: 89)
pcDNA6-F	5'-CACTGCTTACTGGCTTATCG AAATTA-3' (SEQ ID NO: 56)	hFc-L235E-R	5'-AAGAGGAAGACTGACGGTCCCCC CTCGAG -3' (SEQ ID NO: 40)
huH12-F	5'-GTTTCCGGTGGCTCCATCTC CGACTACGGTGTGACTGGA -3' (SEQ ID NO: 90)	huH12-R	5'-TCCAGTCAACACCGTAGTCGGAG ATGGAGCCACCGGAAAC -3' (SEQ ID NO: 91)
huH13-F	5'-GTTTCCGGTGGCTCCATCTCCGAT ACGGTGGGACTGGATCCGTCAG -3' (SEQ ID NO: 92)	huH13-R	5'-CTGCAGGATCCAGTCCCAACCGT AGTCGGAGATGGAGCCACCGGAAAC -3' (SEQ ID NO: 93)

huH14-F	5'-GTTCCACCGACTACAACCCC TCTCTGAAATCCCCT-3' (SEQ ID NO: 94)	huH14-R	5'-ACGGGATTTTCAGAGAGGGGTT GTAGTCGGTGGAAC -3' (SEQ ID NO: 95)
huH15-F	5'-GTTCCGGTGGCTCCATCTCCTCTAC TATTGGTCTGGATCCGTCAG -3' (SEQ ID NO: 96)	huH15-R	5'-CTGACGGATCCAGGACCAATAGTA GGAGGAGATGGAGCCACCGAAAC -3' (SEQ ID NO: 97)
huH16-F	5'-GAATGGATCGGTTATATCTATTATTC CGTTCCACCAACTACAACCCCTCT -3' (SEQ ID NO: 98)	huH16-R	5'-AGAGGGGTTGTAGTTGGTGAACCG GAATAATAGATATAACCGATCCATTC -3' (SEQ ID NO: 99)

A continuación se examina la importancia de los residuos murinos restantes (v.g., H31, H33, y H35) en la HCDR1 humanizada en la variante H14, cambiando estos residuos por sus contrapartidas humanas en la secuencia VH de la línea germinal 4-59 (v.g., un cambio D31S, G33Y y D35S). El constructo resultante, H15, tiene una secuencia de GGSISSYYVS (SEQ ID NO: 110) para HCDR1 comparada con la secuencia parcialmente humanizada de GGSISDYGWD (SEQ ID NO: 111) en H14. Finalmente, la HCDR2 entera de H15 se convierte en su contrapartida humana en VH4-59 (desde **MIWGDGSTDYNSALKS** (SEQ ID NO: 8) a **YIYYSGSTNYPNPSLKS** (SEQ ID NO: 119), un total de 7 diferencias de residuos) para crear otra variante, H16, que tiene una HCDR1 y HCDR2 completamente humanas. Las variantes H15 y H16 se aparean individualmente con la variante de cadena ligera L10 para producir las variantes de anticuerpos H15-L10 y H16-L10, respectivamente.

Estas variantes se valúan en un ensayo de aglutinación plaquetaria para determinar sus actividades. Los datos presentados en la Tabla 14 sugieren que el reemplazamiento de la HCDR1 entera con secuencia humana anula la actividad anti-vWF. Esto sugiere que los tres residuos remanentes en la HCDR1 (v.g., D en la posición H31, G en la posición H33 y D en H35) son importantes para la retención de actividad, aun cuando estos residuos pueden no estar en contacto directamente con el antígeno, como es sugerido por la estructura cristalina consignada por Celikel, *et al* (Nat. Struct. Biol. 5:189). El reemplazamiento de HCDR2 enteramente con la HCDR2 humana 4-59 no restablecía la actividad perdida de H15, coherentemente con las indicaciones de los estudios cristalográficos de Celikel *et al.*, que sugieren que tres de los residuos en HCDR2 (v.g., H53, H54, y H58) interaccionan directamente con el antígeno de vWF.

20 **Tabla 14:** Valores  $CE_{50}$  de las variantes "super-humanizadas"

Anticuerpo	$CE_{50}$ (nM)
Quimera NMC-4	0,18±0,03 (n=9)
H9, L9 (Injertado en CDR)	0,12 (n=2)
H12, L9	0,29
H13, L9	0,16 (n=2)
H14, L9	0,13 (n=2)
H13, L10	0,20
H14, L10	0,22±0,05 (n=5)
H14, L11	1,63
H15, L10	ND
H16, L10	ND

**Ejemplo 3:** Reformateado de Isotipos de anticuerpos

En un método ilustrativo, puede ser deseable reformatear variantes de VH a partir del formato mutado IgG1 a un formato IgG4, dado que IgG1 es un isotipo activo con respecto a la activación del complemento y suscitación de respuestas efectoras, en tanto que IgG4 es relativamente inactivo. Por ejemplo, variantes de VH candidato se convierten del formato IgG1 mutado a un formato IgG4 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 144) para generar candidatos para desarrollo. Adicionalmente, los marcos de lectura abiertos de cadenas ligera y pesada se rediseñan para incorporar sitios de escisión por endonucleasas de restricción en los extremos 5' (v.g., sitios *XhoI* y *HindIII*) y 3'

(v.g., sitios *Bam*HI y *Not*I), a fin de facilitar la subclonación en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pSTO518 para desarrollo de líneas de células aguas abajo y producción de anticuerpos en gran escala (Tabla 15).

Por ejemplo, dos de las variantes VH humanizadas, H9 y H14 se convierten a un formato IgG4 por reemplazamiento de la región constante de IgG1 con una región constante de IgG4 e introducción de sitios *Xho*I y *Bam*HI en el extremo 5' y sitios *Hind*III y *Not*I en el extremo 3' de la casete de expresión de la cadena pesada. Tanto IgG1 como IgG4 contienen un sitio *Apal* existente naturalmente cerca de la unión de las regiones variable y constante. Este sitio se utiliza para clonación en la IgG4 en lugar de la IgG1. Los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I se sitúan en el extremo 3' de la secuencia a fin de facilitar la subclonación posterior en el vector pSTO518. La secuencia de región constante de IgG4 delecionada de intrones desde el sitio *Apal* al codón de terminación, con los sitios *Bam*HI y *Not*I añadidos, es sintetizada habitualmente por Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA). Adicionalmente, la secuencia señal en el vector pSTO518 se cambia a una secuencia conductora Igk por realización de una PCR solapante con cebadores que están diseñados para incorporar sitios *Xho*I y *Hind*III en el extremo 5' de las regiones variables de cadena pesada y para insertar la secuencia señal Igk.

Las secuencias de la cadena pesada H9 y H14 son idénticas en las regiones cebadoras, por lo que se utilizan para ambas los mismos cebadores y estrategia de clonación. Se obtienen dos productos PCR separados, cada uno de los cuales incorpora uno de los cambios requeridos en la región variable de la cadena pesada huNMC4-H9 (y huNMC4-H14). Una reacción PCR que incorpora los sitios de restricción *Xho*I y *Hind*III en el cebador directo y amplifica el péptido de señal Igk se realiza utilizando pIRESdsRED-HUL10 como el modelo y los cebadores IgKLF (SEQ ID NO: 100) e IgKHnmcR (SEQ ID NO: 101) (véase, Tabla 15a y Tabla 15b). Esto va seguido por un segundo paso de reacción que utiliza pCDNA6-H9 (o pCDNA6-H14) como el modelo y los cebadores 14 VHF (SEQ ID NO: 102) y 14 VHR (SEQ ID NO: 103) y se solapa con la primera reacción PCR en 30 nucleótidos. El producto PCR contiene la región variable H9 (o H14) así como los 5 primeros aminoácidos de la región constante de IgG1 hasta el sitio *Apal*. Los 5 primeros aminoácidos de la región constante no difieren entre IgG1 e IgG4. La reacción añade también un sitio *Not*I después del sitio *Apal* a fin de facilitar la clonación de la región variable antes de la inserción de la región constante IgG4. El conductor kappa es añadido aguas arriba por el tercer paso PCR que utiliza los productos de reacción de los dos primeros pasos como modelo, siendo el cebador directo de la primera reacción (IgKLF) y el cebador inverso de la segunda reacción (14VHR). El producto de esta reacción se digiere con *Xho*I/*Not*I y se inserta en la cadena principal del plásmido digerido análogamente pCIneo. Esta ligación produjo el compuesto intermedio de clonación pCI-NMC4-VH9var o (pCI-NMC4-VH14var), que contiene el conductor de Igk y la región variable de NMC4-H9 (o H14). El plásmido de Blue Heron Biotechnology, que contiene la región constante de IgG4 sintetizada *de novo*, se digiere con *Apal* y *Not*I, el fragmento de región constante de IgG4 de 1 kb se purifica en gel y se ligera al pCI-NMC4-VH9var o (pCI-NMC4-VH14var) digerido con *Apal*/*Not*I. Esto produjo los plásmidos pCI-NMC4-VH9 y pCI-NMC4-VH14. Después de transformación en células DH5 $\alpha$ , las inserciones plasmídicas de los clones individuales se secuencian a fin de verificar que las mismas son correctas.

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

Nombre	Secuencia
IgKLF	5'CCTATCTCGAGAAGCTTCCACCATGGAGACAGACACACTCCT (SEQ ID NO: 100)
IgKHnmcR	5'ACCCGGACCGGATTCCTGCAGCTGCACCTGTCCAGTGGAACTGGAACCCAGAGC (SEQ ID NO: 101)
14VHF	5'CAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTCCG (SEQ ID NO: 102)
14VHR	5'CCTATGCGGCCGCGGGCCCTTGGTGGAAAGCGGAGGAAACGGT (SEQ ID NO: 103)

**Tabla 15b.** Reacciones PCR utilizadas para la construcción de la cadena pesada

PCR	Cebador Directo	Cebador Inverso	Modelo	Producto
1 <sup>a</sup>	IgKLF	IgKHnmcR	pIRESdsRed-huL10	<i>Xho</i> I, <i>Hind</i> III, péptido señal IgK
2 <sup>a</sup>	14VHF	14VHR	pCDNA6-huH9, (o pCDNA6-huH14)	región variable hu-H9, <i>Apal</i> , <i>Not</i> I (o región variable hu-H14, <i>Apal</i> , <i>Not</i> I)
3 <sup>a</sup>	IgKLF	14VHR	Productos de las dos reacciones PCR anteriores	región variable Hu-VH9 (o VH14)

- Los cambios en las cadenas ligera L9 y L10 se realizan por PCR. Dado que las cadenas ligeras L9 y L10 son idénticas en las regiones cebadoras, se utilizaron para ambas los mismos cebadores y la misma estrategia. Se producen dos modelos PCR separados para cada cadena ligera. El primer paso PCR incorpora sitios de restricción *XhoI* y *HindIII* en el extremo 5'. El segundo paso PCR se solapa por los 30 primeros nucleótidos e incorpora sitios *BamHI* y *NotI* en el extremo 3' del fragmento. Estos dos productos PCR solapantes separados se utilizan como modelos en la tercera reacción PCR para obtener un producto PCR solapante final que incorpora estos cambios por amplificación de los mismos utilizando el cebador directo del primer paso PCR y el cebador inverso del segundo paso. El producto de la tercera reacción PCR se digiere con *XhoI/NotI* y se inserta en el plásmido pCI-neo análogamente (Invitrogen), produciendo los plásmidos pCI-NMC4-VL9 y pCI-NMC4-VL10 (véanse la Tabla 16a y la Tabla 16b para cebadores ilustrativos y la estrategia utilizada para construcción de la cadena ligera).

**Tabla 16a.** Cebadores utilizados en las reacciones PCR de la cadena ligera

Nombre	Secuencia
IgKLF	5'CCTATCTCGAGAAGCTTCCACCATGGAGACAGACACTCCT (SEQ ID NO: 100)
IgKLNMCr	5'GCTGCTGGGGCTCTGGGTCATCTGGATGTCTCCAGTGGAACTGGAACCCAGAGC (SEQ ID NO: 104)
10VLF	5'GACATCCAGATGACCCAGAGCC (SEQ ID NO: 105)
hKcR	5'CCTATGCGGCCGCGGATCCTATCAAACTCTCCCCTGTTGAAGCTCT (SEQ ID NO: 106)

**Tabla 16b.** Reacciones PCR para la construcción de la cadena ligera

PCR	Cebador Directo	Cebador Inverso	Modelo	Producto
1ª	1	2	pIRESdsRED-huL10	XhoI, HindIII, péptido señal
2ª	3	4	pIRESdsRED-huL9 pIRESdsRED-huL10	o región variable huL9 o huL10 y región constante hlgk , BamH1, NotI
3ª	1	4	Productos de la 1ª y 2ª PCR	Casetes de secuencia NMC4-VL9 o NMC4-VL10 IgG4

- 15 Los isotipos IgG4 de H9-L9 y H14-L10 se generan a partir de células HEK293T como se ha descrito arriba en el Ejemplo 1 y se purifican por cromatografía de afinidad de Proteína A. Los anticuerpos purificados se testan luego en el ensayo de aglutinación plaquetaria mediada por vWF a fin de determinar su potencia relativa. Como se muestra en la Tabla 17, la conversión en el isotipo IgG4 no tenía efecto alguno sobre la potencia.

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

Variante de anti-cuerpo	Isotipo	Valor medio de aglutinación de las plaquetas CE <sub>50</sub> (de 2 experimentos independientes)
Quimera NMC-4	Quimera IgG1	1,25 nM (1,3nM, 1,2nM)
H9-L9	IgG1	1,30 nM (1,3nM, 1,3nM)
H9-L9	IgG4	1,40 nM (1,3nM, 1,5nM)
H14-L10	IgG1	1,20 nM (1,1nM, 1,3nM)
H14-L10	IgG4	2,15 nM (2,3nM, 2,0nM)

**Ejemplo 4: Fijación de Anticuerpos a vWF o al Dominio A1**

**Clonación del antígeno del dominio A1 marcado con His:** Sin quedar ligados por una teoría de la descripción, se supone que NMC-4 se fija al dominio A1 de vWF, que normalmente está accesible sólo cuando se activa vWF (v.g. en condiciones de alta cizalladura). Como enfoque alternativo, puede ser deseable expresar el dominio A1 aislado de vWF, que según se ha informado se fija a GP1ba con potencia equivalente a la del vWF intacto activado (Celikel *et al.*, 1997). Para ello, el dominio A1 se clona a fin de servir como sustrato para estudios de fijación en micropocillos. Un clon plasmídico que contiene el cDNA de vWF humano de longitud total se adquiere de ATCC (Cat #67122). El dominio A1 de vWF (v.g., residuos 499-729) y amplifica a partir de este clon con los cebadores vWF-A1-For(5'-CCCAGGAATTCCTCGGAACCGCGTTGCAC-3') (SEQ ID NO: 112) y vWF-A1-Rev (5'-CCGATGCGGCCGCTCACCTCTTGGGCCCCAG-3') (SEQ ID NO: 113). El producto PCR se purifica en gel, se digiere con *EcoRI* y *NotI*, y se clona en el vector pETDuet-1. El producto ligado se transforma en células competentes DH5 $\alpha$  a fin de producir la forma oxidada del dominio A1.

Para construir un plásmido que expresa el dominio A1 de rata, se aísla DNA genómico de rata a partir de hígado de rata con el reactivo DNAzol siguiendo el protocolo del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cat #DN127, Cincinnati, Ohio). El DNA genómico se utiliza luego para una reacción PCR con los cebadores (Rat-vWF-A1-F (5'-AGCGAATTCCTCGGAACCGCGTTGCAC-3') (SEQ ID NO: 114) y Rat-vWF-A1-R (5'-AGTGCGCCGCTTACACCTTTTGGGTCCTGGTGTGAAACC-3') (SEQ ID NO: 115). El producto PCR se digiere con *EcoRI* y *NotI* y se clona en los mismos sitios del vector pETDuet-1. Los productos ligados se transforman en células competentes DH5 $\alpha$ .

Un litro de medio de cultivo bacteriano (LB o 2xYT) que contiene los antibióticos carbenicilina, kanamicina, y tetraciclina se inocula con un cultivo bacteriano nocturno de 25 ml (v.g., la cepa Origami B que lleva los plásmidos p35 [pET-Duet-Rat-A1] o p36 [pET-Duet-Human-A1]). El cultivo se deja crecer a 37°C en una máquina de sacudidas hasta una DO<sub>600</sub> de 0,6-0,8. La expresión de las proteínas recombinantes se induce por adición de IPTG hasta una concentración final de 1 mM y el crecimiento del cultivo se continúa luego a 37°C durante 4-5 horas más antes de cosechar las bacterias por centrifugación a 6000 rpm en un rotor JA-10 (Beckman). El sedimento de células se congela a -80°C o se procesa inmediatamente por resuspensión del sedimento en 20 ml de PBS que contiene dos tabletas disueltas de Inhibidores Protease completos (Roche), sometiendo la suspensión de células resultante a dos ciclos de dos minutos de disrupción celular (v.g., Branson Sonifier 250 provisto de una micro-boquilla en un ajuste de ciclos de servicio constante y ajuste de control de salida de 1-2) mientras se encuentra en hielo. El lisado de células se centrifuga a 16.000 rpm en un rotor JA-20 (Beckman) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtra a través de un filtro de jeringuilla de 0,45  $\mu$ m antes de la aplicación a una columna de 2 ml compactada con gel His-Select HF Nickel Affinity (Sigma) que se ha equilibrado en tampón de fijación (imidazol 5 mM, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). La cromatografía se realiza utilizando una bomba de jeringa que regula el caudal a 1 ml/min. Después de lavar la columna con 20 ml de tampón de fijación, se eluyen las proteínas con imidazol 250 mM, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, y se recogen fracciones de 1 ml. La mayor parte de la proteína se eluye dentro de las 4 primeras fracciones de la elución. El tamaño (-28 kD) y la integridad de las proteínas se monitorizan en un gel de SDS-poliacrilamida teñido con Coomassie. Se agrupan las fracciones pico, se concentran a 2,5 ml en caso necesario, y se desalan en PBS utilizando una columna PD-10 (Amersham/GE-Healthcare). La concentración de proteínas se determina utilizando un ensayo de proteínas Lowry (BioRad DC Protein Assay).

**Cinética de fijación:** Para evaluar los valores  $K_{on}$ ,  $K_{off}$  y  $K_d$ , se realizan ensayos de sensibilidad por los cuales se sintetizan y purifican conjugados de anticuerpo europeo (quelato N1). La fijación de estos anticuerpos de control quiméricos NMC-4 marcados con Eu e isotipo al antígeno A1 inmovilizado se mide utilizando un fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por disociación (DELFLIA).

Por ejemplo, un anticuerpo de control (v.g. MOPC-21 control isotipo, un IgG1/k de plasma de mieloma humano; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la quimera NMC-4 se marcan con Eu. Resumidamente, el anticuerpo se añade a tampón de fosfato de sodio filtrado en condiciones estériles (96 mM, pH 7,4) y se dializa extensamente en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,4, NaCl 138 mM y KCl 2,67 mM) para eliminar las aminas primarias de peso molecular bajo. Los anticuerpos dializados se concentran en un concentrador MicroSep lavado a 9500 rpm (7000xg) en un rotor JA-20 durante 20 minutos a 4°C. Se ajusta el anticuerpo a 4,0 mg/ml con PBS que contiene una concentración final de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 9,3. La mezcla mAb/bicarbonato (0,250 ml) se mezcla en un vial que contiene 0,2 mg de ácido N<sup>1</sup>-(*b*-isotiocianatobencil)-dietileno-triamina-N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>3</sup>-tetraacético quelado con Eu<sup>3+</sup> (Eu-N1-ITC; Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA) por pipeteado alternativo moderado. La mezcla de anticuerpo y quelato reactivo con amina se deja reaccionar durante una noche a 4°C sin agitar.

Se aplica una mezcla de anticuerpo marcado a una columna NAP-10 separada (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) pre-equilibrada con PBS. Se recogen fracciones (v.g., 0,5 ml) utilizando PBS para el tampón de la columna. Las muestras se ensayan respecto a proteína total (v.g., reactivo Bradford; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) utilizando un lector de placas de absorbancia SpectraMax 384 y se ensayan respecto a Eu, después de dilución 1:10.000 en Solución Intensificadora DELFLIA (Perkin-Elmer), por fluorescencia resuelta en tiempo (TRF) utilizando un lector de placas multi-etiqueta Victor 2 (Perkin-Elmer). Las fracciones que son positivas a la vez para proteína y etiqueta Eu se agrupan y se aplican a nuevas columnas NAP-10 pre-equilibradas con Tampón de

Ejecución (Tris 50 mM, pH 7,4 y NaCl 138 mM). Las fracciones de estas columnas que son positivas a la vez para proteína y etiqueta Eu se agrupan y se aplican a columnas PD-10 pre-equilibradas con Tampón de Ejecución, y las fracciones positivas para proteína y etiqueta Eu se agrupan y ensayan respecto a proteína total y respecto al contenido de Eu por TRF calibrada contra una solución estándar de europio (Perkin-Elmer). Finalmente se calcula la ratio agente fluorescente:proteína.

Pocillos de placas Immulon-4 se recubren con el dominio His-A1 de vWF humano (v.g., 25 ng en 100 µl/pocillo en Tris 30 mM, pH 7,4 y NaCl 300 mM o PBS exenta de cationes divalentes) o de rata (v.g. 50 ng/pocillo) por incubación durante una noche a 4°C. Se lavan las placas 3 veces con Tampón de Lavado (v.g., HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20), bloqueado con 300 µl/pocillo de Tampón de Bloqueo (v.g., Tampón de Lavado que contiene 3,0 mg/ml de BSA exento de IgG y 0,1% de acida de sodio) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavan 5 veces con Tampón de Lavado antes de su utilización.

Los ensayos de fijación en equilibrio se realizan como sigue. Se diluye Eu-anticuerpo en Tampón de Fijación (v.g. Tampón de Lavado que contiene 100 µg/ml de BAS exento de IgG y 0,1% de acida de sodio) y se aplica a los pocillos (v.g., 10 µl/pocillo) de una placa de 96 pocillos, y las placas se sellan con film SEALPLATE. Se agitan las placas mediante sacudidas (v.g. Titer Plate Shaker con ajuste de velocidad de 4 durante ≥ 15 s o 60 s a la temperatura ambiente), se colocan en cajas Nalgene que contienen toallitas de papel húmedas, y se incuban en las cajas cerradas durante 2 horas a 37°C. Para la medida de la etiqueta libre, se transfieren muestras del sobrenadante (4,0 µl) de los pocillos que contienen las mezclas de fijación a un conjunto paralelo de pocillos que contienen Solución de Intensificación DELFIA (100 µl/pocillo). Para evaluar el anticuerpo fijado, los pocillos recubiertos de A1 con las mezclas de fijación remanentes se lavan 5 veces con Tampón de Lavado, se vacían sobre toallitas de papel y se añade Solución de Intensificación DELFIA (100 µl/pocillo) a pocillos vacíos para la medida de la etiqueta fijada. Para calibración del ensayo, se añade Solución de Intensificación DELFIA (100 µl/pocillo) a pocillos no usados y se añade europio estándar (1,0 µl/pocillo). Las placas se agitan mediante sacudidas (v.g., Titer Plate Shaker con velocidad de ajuste durante 10 minutos a la temperatura ambiente), y se leen las intensidades de fluorescencia resueltas en tiempo (TRF), utilizando un lector de placas multi-etiqueta Victor2 (Perkin-Elmer Wallac, Boston, MA). La fijación se normaliza para el contenido de quelato de europio por la ratio flúor:proteína (F:P) para los anticuerpos respectivos. La fijación específica se calcula deduciendo la fijación inespecífica (v.g., fijación media por el control isotipo marcado con Eu) de la fijación total (v.g., fijación por Eu-NMC-4). El número de sitios de fijación y los valores  $K_d$  se calcula por el método de Scatchard (1949). Se construyen gráficas de Hill para evaluar la fijación, representando gráficamente  $\log(v/(n-v))$  frente al  $\log$  de la concentración de Eu-NMC-4 libre, donde  $n$  = el número de sitios de fijación de afinidad alta/pocillo,  $v$  = el número medio de Eu-NMC-4 mAb/pocillo fijado específicamente, y la quimera Eu-NMC-4 libre se calcula a partir de las lecturas TRF medidas en la fase de solución.

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

Las cinéticas de asociación se determinan utilizando el mismo protocolo, excepto que se reemplaza el tampón de lavado en momentos diferentes con anticuerpo marcado con europio a las concentraciones indicadas (100 µl/pocillo). Las placas se sellan inmediatamente, se agitan mediante sacudidas (v.g. Titer Plate Shaker con ajuste de velocidad de 4 durante 15 segundos a la temperatura ambiente), y se incuban durante los tiempos indicados a 37°C. Las placas que contienen mezclas de fijación se lavan 5 veces con Tampón de Lavado, se vacían en seco sobre toallitas de papel, y se registra el tiempo de lavado para cada placa. Se añade Solución de Intensificación DELFIA (100 µl/pocillo) a los pocillos vacíos para la medida del marcador fijado como se ha descrito arriba. La tasa de asociación aparente,  $K_{on,app}$ , para cada concentración de anticuerpo se mide por ajuste de la fijación específica frente al tiempo con la ecuación siguiente utilizando software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA):

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

La tasa de asociación aparente ( $K_{on,app}$ ) se representa gráficamente frente a la concentración de Eu-mAb. Los datos se ajustan a la ecuación lineal

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

donde la constante de tasa de asociación  $K_{on}$  es la pendiente ajustada, [mAb] es la concentración de Eu-NMC-4, y la tasa de disociación  $K_{off}$  es la ordenada en el origen ajustada.

La semivida calculada para la disociación de la quimera NMC-4 fijada a His-A1 de vWF humano o de rata se calcula por la ecuación siguiente:

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

La fijación específica de Eu-NMC-4 a His-A1 de vWF humano y de rata se ajusta a una ecuación exponencial simple de asociación, a partir de la cual se obtienen las tasas aparentes de asociación  $K_{on, app}$  (v.g., la constante k de ajuste de la curva de asociación exponencial) para cada concentración de anticuerpo marcado. Las tasas de asociación aparente para ambos antígenos son dependientes de la dosis como se muestra en las gráficas de  $K_{on, app}$  frente a concentración de Eu-NMC-4. Los resultados se resumen en la Tabla 17 y revelan que la quimera NMC-4 tenía un valor  $K_d$  de  $0,32 \pm 0,07$  nM para el dominio A humano, y  $0,28 \pm 0,01$  nM para el dominio A1 de rata. En ambos casos, estos resultados están en estrecha concordancia con los valores  $K_d$  deteriorados por la fijación de equilibrio. Los resultados sugieren también que el complejo antígeno-anticuerpo tiene una vida larga para ambas especies A1, con semividas *in vitro* para disociación de 44 minutos y 69 minutos para los antígenos humano y de rata, respectivamente.

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

	His-A1 (humano)	His-A1 (rata)
<b>Constantes cinéticas</b>		
$k_{on}$ ( $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ )	$4,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
$k_{off}$ ( $M^{-1}$ ) <sup>†</sup>	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$
Semi-vida de disociación (min)	44	69
$k_{on} / k_{off}$	0,39 nM	0,70 nM
<b>Fijación de equilibrio (<math>K_d</math>)</b>		
His-A1	$0,316 \pm 0,068 \text{ nM}^{**}$ (n = 10)	$0,276 \pm 0,011 \text{ nM}^{**}$ (n = 5)
<b>Competición homóloga (<math>K_i</math>)</b>		
His-A1	$0,275 \pm 0,064 \text{ nM}$ (n = 4)	$0,297 \pm 0,128 \text{ nM}$ (n = 3)

<sup>†</sup> Ordenada en el origen a partir de la dependencia de la dosis de  $k_{on}$  aparente

<sup>\*\*</sup> $K_d$  para FIJACIÓN DE EU-NMC-4 AL ANTÍGENO RECUBIERTO DIRECTO (HUMANO VERSUS RATA) NO SIGNIFICATIVO ESTADÍSTICAMENTE POR EL TEST T DE SIGNIFICACIÓN (P = 0,6892).

LOS ERRORES ESTÁN DESIGNADOS POR SEM.

Pueden realizarse estudios de fijación competitivos para determinar los valores  $K_i$  (v.g. una medida de afinidad relativa para el antígeno). Los ensayos se realizan como se ha descrito arriba para la cinética de asociación, excepto que en este caso se aplican 8  $\mu$ l/pocillo de Tampón de Fijación (v.g., Tampón de Lavado que contiene 100  $\mu$ g/ml de BSA exenta de IgG, 0,1% acida de sodio), seguido por 10  $\mu$ l/pocillo de Eu-NMC-4 o competidor no marcado con Eu y 10  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo competidor sin marcar en una serie de diluciones seriadas duplicadas que va desde  $10^{-12}$  M a  $10^{-7}$  M. La concentración final de anticuerpo marcado con europio es 100 pM. El nivel de fijación inespecífica de fondo disminuye significativamente en presencia del agente quelante DTPA (1  $\mu$ M) por lo que éste se incluye en los ensayos de fijación competitivos. Adicionalmente, se optimiza el recubrimiento de los pocillos utilizando His-A1 que se ha purificado utilizando gel de yodoacetilo para eliminar cualquier A1 reducido de la preparación de proteína. La mezcla se incuba durante 3,75 horas a fin de permitir que la reacción alcance el equilibrio pleno, se lava y se determina por TRF el anticuerpo marcado fijado como se ha descrito arriba. Las curvas de inhibición se ajustan con el modelo "competición por un solo sitio" utilizando software Prism (GraphPad, Inc.) para obtener valores  $CI_{50}$  y calcular la  $k_i$  utilizando las ecuaciones de Cheng y Prusoff (1973 Biochem Pharm, 29:3099) utilizando los valores  $K_d$  medidos por análisis Scatchard del experimento de fijación de equilibrio.

La estandarización del ensayo de fijación competitiva se demuestra por comparación del valor  $K_i$  obtenido de la competición homóloga por la quimera NMC-4 sin marcar con la afinidad ( $K_d$ ) medida para fijación de Eu-NMC-4 al antígeno. Para competición homóloga con His-A1 humano, la quimera NMC-4 es un inhibidor potente de la fijación de Eu-NMC-4 con un valor  $K_i$  de  $0,28 \pm 0,06$  mM (Tabla 19), lo cual es coherente con el valor  $K_d$  observado de  $0,32 \pm 0,07$  nM. Análogamente, para competición homóloga con His-A1 de rata, la quimera NMC-4 tenía un valor  $K_i$  de  $0,297 \pm 0,128$  nM (Tabla 18), que es coherente con el valor  $K_d$  de  $0,276 \pm 0,011$  nM. En contraste, el control isotipo sin marcar, IgG1/k de plasma de mieloma humano no tenía efecto inhibitorio alguno sobre la fijación de Eu-NMC-4 al antígeno A1.

**Tabla 19.** Comparación de la actividad de fijación ( $K_i$  por ensayo de competición) de variantes humanizadas seleccionadas de NMC

Variante de anticuerpo	Isotipo	K <sub>i</sub> (Valor medio ± SEM)
NMC-4 mAb	mIgG1	0,60 ± 0,13 nM (n=3)
Quimera NMC-4	Quimera IgG1	0,28 ± 0,06 nM (n=4)
Control IgGk	IgG1	no detectable
H2-L5	IgG1	0,96 ± 0,27 nM (n=3)
H9-L9	IgG1	3,51 ± 1,21 nM (n=4)
H9-L9	IgG4	3,53 nM (n=1)

Se utiliza luego el ensayo de fijación competitiva para testar la potencia de las variantes humanizadas de NMC-4 H9L9 IgG1 y 4. Los dos isotipos de la variante H9L9 injertada en CDR exhibían actividad nM idéntica, aunque menos potente que la quimera NMC-4 homóloga (Tabla 19).

- 5 El anticuerpo AJW-200 se ensaya en el ensayo de fijación competitiva. En contraste, con las variantes NMC-4 humanizadas, que competían por la fijación de Eu-NMC-4 a His-A1, la fijación de Eu-NMC-4 a His-A1 es intensificada por AJW200 con un valor CE<sub>50</sub> de 210 pM (Figura 2). Las gráficas Hill de la fijación de Eu-NMC-4 a His-A1 muestran pendientes de Hill próximas a la unidad ( $n_H = 0,984$  y  $0,957$ ), coherentes con la fijación a una sola clase de sitios de fijación sin cooperatividad. En contraste, las gráficas de Hill de la fijación de Eu-NMC-4 a His-A1 en presencia de AJW200 1,8 nM o 20 nM (Figuras 2C y 2D, respectivamente) exhiben pendientes de Hill mayores que 1 ( $n_H = 1,548$  y  $1,201$ ), que indican cooperatividad positiva. La cooperatividad positiva mediada por AJW200 se observa en dos experimentos independientes realizados en dos días distintos. Estos resultados no sólo confirmaban que NMC-4 se fija a un sitio de fijación separado que AJW200 en el dominio A1 de vWF, sino que indican también que, al menos para el fragmento A1 aislado, AJW200 potencia la fijación de NMC-4 al sitio de fijación GP1ba.

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

Una confirmación de que un anticuerpo bloquea el sitio de fijación del receptor GP1ba en vWF es su capacidad para antagonizar las interacciones vWF-GP1b en condiciones naturales de flujo. Un enfoque que ha sido desarrollado por Moake y colegas (1986, J Clin Invest. 78:1456-61) aprovecha el hecho de que cuando las células endoteliales son activadas con histamina, secretan una forma ultra-larga de vWF (ULvWF), donde el dominio A1 está en conformación abierta (v.g. activa). Éstas se rompen rápidamente después de introducción de plasma, debido a escisión de la ULvWF mediada por ADAMS13 (Dong *et al.*, 2002 Blood 100: 4033-9).

En un método ilustrativo, HUVECs de primer paso (P1) se dividen y se siembran en cápsulas de 35 mm a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/cápsula, se cultivan durante 7 días, y se utilizan el día 7 (2-3 días después que las mismas alcanzan 100% de confluencia). Las plaquetas humanas marcadas con CFSE se adhieren rápidamente a las HUVECs a una tasa de flujo de 1,2 ml/min (Figura 3A). Un número mucho mayor de plaquetas se fijan a HUVECs cuando las células se tratan previamente con histamina 25  $\mu$ M durante 10 minutos a la temperatura ambiente (Figura 3B). Esta adhesión de las plaquetas se inhibía completamente cuando las plaquetas se sometían a perfusión sobre la monocapa en tampón que contenía NMC-4, a una concentración de 10  $\mu$ g/ml (Figura 3C) y se bloqueaban parcialmente cuando las plaquetas se perfundían en presencia de un anticuerpo anti-GP1ba (v.g., AK2), a una concentración de 18  $\mu$ g/ml (Figura 3D). En contraste, IgG de ratón de control a una concentración de 18  $\mu$ g/ml no impedía la adhesión plaquetaria a los polímeros vWF (Figura 3E) lo que sugería que la adhesión de las plaquetas a las HUVECs está mediada de hecho por la interacción entre vWF derivado de endotelio y GP1ba plaquetaria. Cuando el área cubierta por las plaquetas de las 20 imágenes capturadas por operación se midió y se cuantificó utilizando software Compix, NMC-4 reducía la adhesión plaquetaria en proporción > 95% comparada con un efecto insignificante por el anticuerpo de control.

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

El modelo de trombosis arterial por cloruro férrico se utiliza para evaluar la actividad anti-trombótica de la quimera NMC-4 y el derivado humanizado (v.g., H14, L10) comparado con AJW200. La arteria carotídea contra-lateral se aísla por la reubicación de la glándula salivar y tejido adiposo acompañante al lado craneal de la incisión. La arteria carótida se deja al descubierto y se coloca sobre una pieza de papel de filtro (v.g., 4 mmx5 mm) que se pliega para abrazar la arteria carótida y proporcionar una superficie para la solución de cloruro férrico (7,5%). Después de aplicar la solución de FCl<sub>3</sub> durante 4 minutos, se coloca una sonda de flujo alrededor de la arteria carótida y se mide el flujo utilizando un sistema de flujo Transonic Systems Inc. (Ithaca, NY) hasta el tiempo de oclusión (típicamente 10 minutos en ratas de control) o hasta 45 minutos. Se administran a grupos de 4 ratas (n = 6 para solución salina) dosis IV que van desde, por ejemplo, 5 a 0,01 mg/kg de quimera NMC.4, V14, L10, AJW200 o IgG de control en un volumen de 1  $\mu$ l/g de peso corporal de la rata. Las preparaciones de anticuerpos se filtran en condiciones estériles y se ensayan para asegurar un contenido bajo de endotoxina utilizando el LIMULUS AMOEBOCYTE ASSAY KIT

(BioWhittaker) siguiendo el protocolo del fabricante, y se evalúan respecto a mono-dispersidad por análisis HPLC antes de ser utilizadas para estudios en animales.

Como se muestra en la Figura 4, tanto NMC-4 como AJW200 inhibían significativamente la oclusión del vaso. NMC-4 exhibía una DE<sub>50</sub> a una dosis de 0,03 y 0,1 mg/kg similar a AJW200. El derivado humanizado, H14, L10, exhibía también actividad similar con un valor DE<sub>50</sub> comprendido también entre 0,03 y 0,1 mg/kg dosis (Figura 4B).

**Ejemplo 7: Efecto de los Anticuerpos Sobre el Tiempo de Hemorragia y la Pérdida de Sangre**

La pérdida de sangre puede a veces ser un efecto colateral adverso asociado con los agentes antiplaquetarios (v.g., anticuerpos anti-vWF). De acuerdo con ello, puede ser necesario evaluar los anticuerpos humanizados NMC-4 en cuanto a su potencial de contribución a complicaciones hemorrágicas. Para ello, se realiza un ensayo estándar en tiempo de hemorragia, en el que se administra anticuerpo de control, quimera NMC-4 o AJW200 30 minutos antes de realizar una transfección en la cola. Para la transfección en la cola se corta el extremo (v.g. 0,5 mm) de la cola y se pone la cola en un volumen conocido de solución salina caliente, midiéndose el tiempo requerido para que cese la hemorragia. Se mide también la pérdida de sangre por evaluación del contenido de hemoglobina de las células de la sangre recogidas en solución salina durante la evaluación del tiempo de hemorragia. Para esto, se reducen los glóbulos rojos a un sedimento por centrifugación a baja velocidad, se resuspenden en solución salina que contiene 1% de Triton X-100, que se ajusta a un volumen final de 5 ml, y se mide la concentración de hemoglobina de la solución por determinación de la absorbancia a 420 nm.

La quimera NMC-4 exhibía la misma dosis DE<sub>50</sub> de 0,09 mg/kg para un aumento significativo en el tiempo de hemorragia que el derivado humanizado H14-L10. A la dosis de 0,03 mg/kg asociada con la eficacia para estos dos anticuerpos en el modelo de FeCl<sub>3</sub> de trombosis arterial, no había prolongación significativa alguna de la hemorragia o pérdida incrementada de sangre. NMC-4 y su derivado humanizado exhiben una respuesta DE<sub>50</sub> ligeramente mejorada a la dosis que AJW200, cuya dosis DE<sub>50</sub> en la rata para hemorragia incrementada estaba mucho más próxima a su dosis DE<sub>50</sub> para actividad antitrombótica, lo que sugiere que NMC-4 ofrece una ventana terapéutica mejorada comparado con AJW200.

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

Anticuerpo	Tiempo de hemorragia (min) Valor medio ± SEM (n)	Pérdida de sangre (ml) Valor medio ± SEM (n)
Solución salina	3,1 ± 0,3 (16)	0,287 ± 0,088 (9)
NMC-4 (quimera)	DE <sub>50</sub> = 0,09 mg/kg	
0,01 mg/kg	2,7 ± 0,3 (2)	0,059 ± 0,009 (2)
0,03 mg/kg	4,1 ± 0,2 (4)	0,076 ± 0,014 (4)
0,10 mg/kg	19,7 ± 0,9 (2)	1,503 ± 0,485 (2)
0,30 mg/kg	32,7 ± 4,4 (3)	1,501 ± 0,213 (3)
3,00 mg/kg	32,3 ± 2,3 (2)	1,106 ± 0,243 (4)
H14, L10 (humanizado)	DE <sub>50</sub> = 0,09 mg/kg	
0,03 mg/kg	2,03 ± 0,35 (3)	0,094 ± 0,035 (3)
0,10 mg/kg	15,30 ± 1,70 (4)	0,630 ± 0,294 (4)
0,30 mg/kg	26,45 ± 3,09 (4)	1,883 ± 0,312 (4)
AJW200	DE <sub>50</sub> = 0,05 mg/kg	
0,01 mg/kg	2,8 ± 0,25 (2)	0,177 ± 0,059 (2)
0,03 mg/kg	8,2 ± 1,56 (7)	0,250 ± 0,059 (4)
0,10 mg/kg	25,1 ± 0,4 (5)	1,943 ± 0,420 (2)
0,30 mg/kg	29,2 ± 0,72 (5)	2,074 ± 0,521 (3)
3,00 mg/kg	30,9 ± 0,62 (3)	2,912 ± 0,243 (4)

Otro parámetro de efectos secundarios adversos de estos anticuerpos sobre la hemostasis es la pérdida de sangre, que se ensaya sobre la sangre recogida mientras se determinan los tiempos de hemorragia. Una vez más, a dosis mayores que 0,1 mg/kg, estos anticuerpos inducían una pérdida de sangre significativa. Sin embargo, a dosis de 0,3 y 3 mg/kg, AJW200 causaba una pérdida de sangre notablemente mayor que la quimera NMC-4 a las mismas dosis, aunque estas diferencias se aproximaban sólo a significación estadística para los grupos de 3,0 mg/kg, donde n = 4 en lugar de 3 (Tabla 20). La variante del anticuerpo H14, L10 no exhibía diferencia significativa alguna con respecto a la quimera paterna NMC-4.

#### Ejemplo 8: Efecto de los Anticuerpos Sobre el Recuento Circulante de Plaquetas y Glóbulos blancos

Se supone que algunos agentes anti-plaquetarios inhiben la formación de trombosis mientras que pueden causar al mismo tiempo trombocitopenia (Hansen *et al.*, J Pharmacol Exp Ther. 298: 165-71 (2001)). Para determinar el efecto de NMC-4 sobre los números de glóbulos blancos (WBC) y plaquetas circulantes en los animales tratados, se inyectan un grupo de 5 ratas con un peso de 230-260 g (v.g., por vía intravenosa) con NMC-4 a 1 mg/ml y se inyecta un grupo de control de 3 ratas con un control de vehículo (v.g. PBS de grado quirúrgico). Antes de la inyección, se utiliza una hemorragia en la cola para medir los recuentos base de células de la sangre utilizando, por ejemplo, el HEMAVET HEMATOLOGY ANALYZER™ (Drew Scientific). Se recogen muestras de sangre en momentos previamente especificados hasta 48 horas (v.g., 30 minutos, 2, 4, 24 y 48 horas) después de la inyección de anticuerpo o solución salina de ratas no anestesiadas por extracción retro-orbital utilizando una pipeta capilar. Se transfieren luego aproximadamente 40 µl de sangre a un tubo que contiene 5 µl de solución anticoagulante citrato-dextrosa acidificada (ACD) y se muestrean inmediatamente en un contador de células HEMAVET a fin de determinar el número de plaquetas y glóbulos blancos. Para cada extracción de sangre, se toman muestras de ojos alternantes.

NMC-4 tenía poco efecto sobre el recuento de plaquetas en cualquiera de los puntos analizados. Se observó una disminución temporal en el recuento de glóbulos blancos de 37,5% (p = 0,016) a los 30 minutos después de la inyección, pero se observó también una disminución similar después de la inyección del vehículo PBS. Los niveles de glóbulos blancos volvían a la línea base entre 2 y 4 horas después de la inyección, tanto en el grupo tratado con NMC-4 como en el tratado con vehículo de control.

#### Ejemplo 9: Establecimiento de Líneas de Células para Expresión de Anticuerpos

Puede desarrollarse un sistema de expresión de proteínas de mamífero de alto rendimiento que está basado en una plataforma de Expresión de Cromosomas Artificiales (ACE) murinos, que ha sido modificado por ingeniería genética para contener sitios aceptores de recombinación múltiples de acción específica, que pueden cargarse con secuencias de genes heterólogos utilizando una integrasa lambda mutante (v.g., la integrasa ACE) en combinación con un vector lanzadera de direccionamiento (Lindenbaum *et al.* (Nucl. Acids. Res. 32 (21): e 172 (2004); Solicitudes de Patente U.S. Núms.: 2003/0119104A1 y 2006/0246586A1). Este sistema se utiliza para generar líneas de células estables para expresión de variantes humanizadas seleccionadas y la quimera NMC-4.

Las inserciones de los plásmidos pCI-NMC4-VL10 y pCI-NMC4-VH14 se digieren con *NotI* más *HindIII* (vector de cadena ligera) o *XhoI* y *BamHI* (vector de cadena pesada) y se clonan secuencialmente en la MCS1 (cadena ligera) y MCS2 (cadena pesada) del vector pST0518. El vector pST0518 que lleva las inserciones de las cadenas pesada y ligera en tándem sirve como el vector lanzadera para transferencia a los Vectores de Direccionamiento ACE (ATVs) con genes de resistencia diferentes, derivados de los vectores de direccionamiento descritos por Lindenbaum *et al.* (Nucl. Acid Res. 32 (21):e172 (2004); Solicitudes de Patente U.S. Núms: 2003/0119104A1 y 2006/0246586 A1). Para transferir la casete que contiene ambas cadenas pesada y ligera de los anticuerpos en los ATVs, el vector pST0518-VH14, VL10 se digiere con las endonucleasas 'homing' I-CeuI y PI-SceI (New England Biolabs, MA). El fragmento VH14 más VL10 se purifica en gel y se clona en los sitios equivalentes del pZeo y pHygro-ATV predigerido con las mismas endonucleasas I.ceuI y PI-SceI. Esto produce los plásmidos pNHT605-H14L10-IgG4 (gen *hyg<sup>R</sup>*) y pNHT607-H14L10-IgG4 (gen *p zeo<sup>R</sup>*).

Análogamente, se construyen vectores de direccionamiento pST0518 portadores de la quimera NMC-4 IgG4, y la inserción en tándem se subclona en los vectores pZeo y pHygro ATV que proporciona los plásmidos pNHT623 (quimera IgG4 humana más el gen *hyg<sup>R</sup>*) y pNHT624 (quimera IgG4 humana más el gen *Zeo<sup>R</sup>*).

Para integración direccionada en la plataforma ACE, se siembran células de la plataforma hospedadora ChK2 ACE a una densidad de  $0,4 \times 10^5$  células por pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos y se cultivan durante una noche. Tres horas antes de la transfección, el medio de cultivo se reemplaza con medio exento de suero y se transfecta tres horas después con 1 µg del vector y 1 µg del vector de expresión de integrasa ACE complejo con reactivo LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas más tarde, las células se expanden en cápsulas de cultivo de 15 cm, y al día siguiente, se añaden al medio de cultivo 3,0 µg/ml de zeomicina o higromicina (dependiendo del vector utilizado). Después de 14 días de selección, se aíslan las colonias resistentes a los fármacos utilizando anillos de clonación y los clones individuales se amplifican para análisis de la producción de anticuerpos.

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

La eficacia y seguridad del anticuerpo NMC-4 humanizado se ensaya en un modelo animal *in vivo* (v.g. babuino).

En un método ilustrativo, se anestesian babuinos con hidrocloreuro de quetamina (Anaket-V™ de la Premier Pharmaceutical Company) (10 mg/kg IM/30 minutos o cuando se necesita para mantener la anestesia general) y se mantiene su temperatura corporal a 37°C con una tablilla de calentamiento. A continuación, se disecciona suavemente un segmento de 4-5 cm de los vasos femorales exentos de tejido circundante. Se ligan todas las ramas próximas en la arteria femoral y la vena femoral. Se practica luego una pequeña incisión en la arteria femoral y la vena femoral y los extremos de los vasos se insertan y se fijan con seda quirúrgica. Se fija luego tubo de silicona a los extremos de los vasos para desviar la sangre arterial a la vena femoral. La desviación directa de la circulación arterial a la venosa mientras se salvan en derivación los capilares aumenta el flujo sanguíneo hasta aproximadamente 150-300 ml/minuto. Se fija una sonda de flujo ultrasónico de tipo tubo (Transonic Systems Inc., Maastricht, Países Bajos) al tubo de silicona y se deja que se establezca el flujo sanguíneo durante aproximadamente 20 minutos. El flujo sanguíneo medio y fásico se mide continuamente a todo lo largo del experimento utilizándose la desviación para administración de fármaco así como para la toma de muestras de sangre.

A continuación, se lesiona el endotelio de la arteria femoral en un punto próximo al extremo del vaso con un porta-agujas Martin (Hegar-Baumgartner TC Gold de 14 cm, código de producto 20.634.14) por prensado fuerte en el endotelio durante 10 segundos a depresión máxima. Se practican dos lesiones solapantes y se coloca un constrictor ajustable de plástico sobre el sitio de la lesión a fin de reducir el flujo sanguíneo a 10 hasta 20% del valor de la línea base. Se observa una disminución gradual en el flujo sanguíneo debido a la formación de trombo. Cuando el flujo sanguíneo se reduce a  $\leq 5$  ml/min, se abre el constrictor a fin de desalojar el trombo rico en plaquetas. A continuación, se aplica de nuevo la estenosis externa y se reinicia el proceso de formación de trombo. Este patrón repetitivo de disminución del flujo sanguíneo subsiguiente a restauración mecánica se conoce como reducciones cíclicas de flujo (CFRs). Se midió el número de CFRs en función del tiempo. Las reducciones cíclicas de flujo de la línea base (CFRs) se registran durante 30 minutos. Se inyecta solución salina y se monitorizan las CFRs durante 30 minutos más. Se utiliza la variante humanizada de NMC-4 H9L9 IgG4 como se describe en el Ejemplo 3 (a la que se hace referencia ulteriormente en esta memoria como GBR600).

Pueden utilizarse dos métodos para evaluar la hemorragia después de administración del fármaco. En un primer método, se determina el tiempo de hemorragia en el modelo de piel en la superficie del antebrazo. Se aplica un manguito de presión alrededor del brazo y se infla a 40 mm Hg, después de lo cual se induce una herida con el dispositivo Surgicut (ITC, Edison, NJ). El tiempo de hemorragia de la piel se define como el tiempo entre la inducción de la herida y la cesación visual de hemorragia. La sangre se toca levemente cada 15 segundos con papel de filtro, si bien no se toca la herida. Las medidas se detienen cuando el tiempo de hemorragia en la piel excede de 900 segundos (es decir, 15 minutos) y se consideran como 900 segundos.

En el segundo método, se evalúa la pérdida de sangre de una incisión por una anexina V recombinante en un modelo de lesión de la arteria carótida del conejo (véase, v.g., P. Thiagarajan *et al.* (1997), *Circulation* 96 (7): 2339-47). Se realiza una incisión de 2 cm x 0,8 cm en la ingle y se insertan torundas de gasa previamente pesadas, que se reemplazan al final de cada periodo de infusión de la dosis de 30 minutos o cuando las mismas están saturadas con sangre. Todas las gasas se pesan al final del estudio para obtener la pérdida de sangre total. El valor para cada dosis se expresa como una ratio de la gasa en la fase de control salino. El ritmo cardiaco y la presión sanguínea se monitorizan continuamente durante todo el estudio a intervalos de 10 minutos.

Al final de cada periodo de dosificación, se extrae 1 ml de sangre con EDTA, y 10 ml de sangre con citrato, y se determinan el recuento de plaquetas FBC, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, Factor VIII y vWF. Dos partes alícuotas de 300  $\mu$ l cada una se congelan a -80°C para envío a los investigadores para ensayos adicionales de laboratorio *in vitro* en caso necesario. Análogamente, se aspira sangre 0,5, 1, 2, 8, 24 y 48 horas después del final de los estudios de flujo. Al final de la última dosis, se realizan tests de agregación plaquetaria con muestras de test y de control.

Después de la dosis acumulativa (v.g., cuando se observa la inhibición completa de las CFRs), se infunde epinefrina (Intramed) a una dosis de 2,2  $\mu$ g/kg/min durante 20 minutos y se miden de nuevo las CFRs. La epinefrina sola no causa agregación plaquetaria en los babuinos, pero puede restablecer las variaciones cíclicas de flujo anuladas por mejora de otros factores de la agregación plaquetaria (véase, v.g., (G. Anfossi *et al.* (1996) *Eur J Clin Invest.* 26: 353-370).

**Estudios de Eficacia y Seguridad de GBR600:** Los Estudios 1 a 4, descritos más adelante, se realizan para determinar la eficacia y la seguridad de GBR600.

5 Estudio 1: Se realiza un estudio piloto con n = 1 animal para establecer una curva de respuesta a la dosis con cantidades crecientes de GBR600 y a fin de identificar la dosis eficaz para la cual se observa la inhibición máxima de las CFRs. Se determinan la hemorragia del modelo y la hemorragia de la incisión para todas las dosis testadas. Se toman muestras de sangre hasta las 48 horas a fin de establecer la farmacocinética del anticuerpo a la dosis máxima.

10 Se inyectan las dosis crecientes siguientes de GBR600 a intervalos de 30 minutos y se registra el flujo durante toda la duración del estudio: dosis 1, 0,03 mg/kg; dosis 2, 0,1 mg/kg; dosis 3, 0,3 mg/kg; dosis 4, 1 mg/kg; y dosis 5, 10 mg/kg. Se realizan luego tests de hemorragia a los 10 minutos después de la inyección de cada dosis.

15 La Figura 5 y la Tabla 21 describen el efecto de dosis crecientes de GBR600 sobre las CFRs. La arteria se lesiona de nuevo cerca del final de la fase basal de 30 minutos, dado que las CFRs no parecían ser estables. 0,03 mg/kg de GBR600 disminuía el número de CFRs a 5/30 minutos comparado con 8/30 minutos para la fase de solución salina. La infusión de 0,1 mg/kg adicionales inhibía por completo las CFRs. Esto se confirma por el hecho de que una lesión repetida de la arteria no causaba un retorno de las CFRs. La inhibición se observa para todas las dosis crecientes que siguen. Después de la infusión la dosis máxima de GBR600 (10 mg/kg) se infunde epinefrina a una tasa de 2,2 µg/kg/minuto a fin de establecer si se consigue una inhibición fuerte o débil de la deposición de plaquetas. La infusión de epinefrina conducía a un aumento temporal del flujo sanguíneo debido a su efecto sobre la presión sanguínea, pero no invertía la inhibición de las CFRs.

20 **Tabla 21.** Efecto de dosis crecientes de GBR600 sobre las CFRs (0,03-10 mg/kg)

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Número de CFRs
Línea base	0	8
Solución salina	0	8
0,03	0,03	5
0,1	0,13	0
0,3	0,43	0
1	1,43	0
10	11,43	0

Estudio 2: El Estudio 2 se lleva a cabo de una manera similar al Estudio 1, excepto que se incluye una dosis de 0,01 mg/kg al comienzo de la escalada de la dosis, antes de la dosis de 0,03 mg/kg, dado que se ha visto en el Estudio 1 una inhibición parcial de las CFRs a una dosis de 0,03 mg/kg.

25 En el Estudio 2 (véanse, v.g., Figura 6 y Tabla 22), se observa un efecto sobre las CFRs por 0,01 mg/kg de GBR600 (7CFRs/30 minutos comparado con 9 CFRs/30 minutos para solución salina). Sin embargo, la infusión de una dosis adicional de 0,03 mg/kg (dosis acumulada: 0,04 mg/kg) causaba la inhibición completa de las CFRs. La DE<sub>100</sub> de GBR600 es por consiguiente 0,04 mg/kg. La lesión repetida de la arteria no invertía la inhibición de CFRs, lo que indicaba una inhibición verdadera. El efecto inhibitor se mantiene a las dosis mayores hasta la dosis máxima de 10 mg/kg. La infusión de epinefrina conducía a un aumento temporal del flujo sanguíneo debido a su efecto sobre la presión sanguínea, pero no invertía la inhibición de las CFRs.

**Tabla 22.** Efecto de dosis crecientes de GBR600 sobre las CFRs (0,01-10 mg/kg)

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Número de CFRs
Línea base	0	9
Solución salina	0	9
0,01	0,01	7
0,03	0,04	0
0,1	0,14	0
0,3	0,44	0
1	1,44	0
10	11,44	0

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

En el Estudio 3 (véase, v.g., la Figura 7), se observa un efecto sobre las CFRs (reducción de 8 CFRs/30 min a 8 CFRs) por infusión de 0,005 mg/kg de GBR600. Las CFRs disminúan de manera lineal con las dosis crecientes de GBR600. El número de CFRs por periodo de dosificación se muestra en la Tabla 23 y la Figura 8. La Figura 8 representa la disminución lineal en el número de CFRs asociada con dosis crecientes de GBR600. La relación entre el número de CFRs y la dosis de GBR600 se expresa por la ecuación siguiente: los datos se ajustan a esta ecuación con  $R^2 = 0,9901$ .

En el Estudio 3, la  $DE_{100}$  es 0,07 mg/kg comparada con la inhibición completa en el Estudio 2 causada por una dosis acumulada de 0,04 mg/kg. El tiempo entre dosis crecientes es 30 minutos en el Estudio 3. Esta discrepancia en los valores observados de  $DE_{100}$  puede estar causada por una reducción de la concentración de GBR600 en sangre como resultado del aclaramiento inicial del fármaco. La infusión de epinefrina invierte la inhibición de las CFRs. Esto podría estar relacionado con la forma de la curva de CFR a la dosis acumulada de 0,07 mg/kg. La inhibición se invierte lentamente para 0,07 mg/kg de dosis acumulada, lo cual es indicativo de un trombo creciente. En estas condiciones particulares, la epinefrina parece ser capaz de invertir la CFR.

**Tabla 23.** Efecto de las dosis acumuladas de GBR600 sobre las CFRs (0,005-0,07 mg/kg)

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Número de CFRs
Línea base	0	8
Solución salina	0	8
0,005	0,005	7
0,005	0,01	6
0,01	0,02	5
0,01	0,03	4
0,01	0,04	3
0,01	0,05	2
0,01	0,06	1
0,01	0,07	0

Estudio 4: El Estudio 4 se lleva a cabo de manera similar al Estudio 1, con la excepción de que se utiliza clopidogrel como control positivo en tres babuinos para comparar la eficacia y tendencia a hemorragia de GBR600 dosificado a 1, 1,5, 2,5, 5 y 10 mg/kg contra clopidogrel.

En el Estudio 4, clopidogrel inhibía completamente las CFRs a una dosis acumulada de 10 mg/kg en el Babuino 1 y 5 mg/kg en los Babuinos 2 y 3 como se muestra en la Tabla 24 y la Figura 9, que ilustra los resultados del Babuino 3 en la Tabla 24. La infusión de epinefrina invertía la inhibición de las CFRs.

**Tabla 24.** Efecto de las dosis crecientes (1-10 mg/kg) de clopidogrel en los babuinos.

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Número de CFRs Babuino 1	Número de CFRs Babuino 2	Número de CFRs Babuino 3
Línea base	0	13	8	6
Solución salina	0	13	7	8
1	1	8	8	7
1,5	2,5	5	2	2
2,5	5	2	0	0
5	10	0	0	0
10	20	0	0	0

5

**Tiempos de Hemorragia del Modelo:** En los Estudios 1 y 2, los tiempos de hemorragia del modelo son mayores que 15 minutos para todas las dosis mayores que 0,04 mg/kg. En el estudio de control positivo con clopidogrel (Bristol-Myers Squibb/Sanofi Pharmaceuticals) los tiempos de hemorragia del modelo se prolongan en la misma proporción que las dosis acumuladas mayores que 2,5 mg/kg. En el Estudio 3, los tiempos de hemorragia del modelo no se prolongan nunca más de 15 minutos. Los tiempos de hemorragia del modelo no son una medida muy precisa de la tendencia a la hemorragia, dado que exhiben una gran variabilidad en la línea base (véanse, v.g. los valores basales en los Babuinos 1, 2, 3 con clopidogrel). Como tales, los tiempos de hemorragia del modelo no se consideran muy predictivos para hemorragia clínicamente relevante, tal como en un escenario preoperatorio (véase, v.g., Lind *et al.* Platelets, 2ª edición, p 485-493, Michelson AD ed., Academic Press.). El test de hemorragia incisional exhibe menos variación, dado que cuantifica la cantidad real de pérdida de sangre a través de la incisión y tiene un intervalo dinámico mayor. Por tanto, se realiza el test de hemorragia incisional además del test de hemorragia del modelo. Estos datos se resumen en las Tablas 25 y 26.

10

15

**Tabla 25.** Tiempo de Hemorragia del Modelo GBR600 [minutos]

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3
Línea base	0	5,5	6,25	2
Solución salina	0	2,5	7	4,45
0,005	0,005	n.a.	n.a.	5,25
0,005	0,01	n.a.	n.a.	5,25
0,01	0,02	n.a.	n.a.	6
0,01	0,03	n.a.	n.a.	7,45
0,01	0,04	n.a.	n.a.	2,5
0,01	0,05	n.a.	n.a.	3,5
0,01	0,06	n.a.	n.a.	7,45
0,01	0,07	n.a.	n.a.	5,45
0,01	0,01	n.a.	2,45	n.a.
0,03	0,03/0,04	5,25	>15	n.a.
0,1	0,13/0,14	>15	>15	n.a.

0,3	0,43/0,44	>15	>15	n.a.
1	0,143/1,44	>15	>15	n.a.
10	11,43/11,44	>15	>15	n.a.

**Tabla 26.** *Tiempo de Hemorragia del Modelo con Clopidogrel [minutos]*

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Babuino 1	Babuino 2	Babuino 3
Línea base	0	>15	5,5	13
Solución salina	0	n.d.	n.d.	n.d.
1	1	3,5	n.d.	7
1,5	2,5	>15	>15	>15
2,5	5	>15	>15	>15
5	10	>15	>15	>15
10	20	>15	>15	>15

- 5 Las Tablas 27 y 28 presentan los resultados obtenidos con el test de hemorragia incisional para clopidogrel y GBR600. La cantidad de sangre absorbida por la gasa aumentaba inicialmente con la dosis y es auto-limitante a dosis altas. En todos los estudios la mayor hemorragia observada corresponde a la 4ª dosis, después de lo cual el volumen de sangre absorbido por la gasa disminuye y parece tener lugar la curación de la herida. En los Estudios 1 y 2, la hemorragia máxima es similar a la de clopidogrel, aunque el clopidogrel se ensaya en una DE<sub>100</sub> múltiplo de 2-4 y GBR600 en un múltiplo hasta 250. En el Estudio 3, se observa una hemorragia insignificante con todas las
- 10 dosis inyectadas.

**Tabla 27.** *Test de Hemorragia Incisional con GBR600 [múltiplos del valor de la solución salina]*

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3
Línea base	0	n.a.	n.a.	n.a.
Solución salina	0	1	1	1
0,005	0,005	n.a.	n.a.	0,13
0,005	0,01	n.a.	n.a.	0,08
0,01	0,02	n.a.	n.a.	0,05
0,01	0,03	n.a.	n.a.	0,05
0,01	0,04	n.a.	n.a.	0,02
0,01	0,05	n.a.	n.a.	0,03
0,01	0,06	n.a.	n.a.	n.d.
0,01	0,07	n.a.	n.a.	n.d.
0,01	0,01	n.a.	2,5	n.a.
0,03	0,03/0,04	0,125	0,5	n.a.
0,1	0,13/0,14	0,625	4,75	n.a.
0,3	0,43/0,44	3,125	7,75	n.a.

1	0,143/1,44	7,625	5,75	n.a.
10	11,43/11,44	4	1,75	n.a.

**Tabla 28.** Test de Hemorragia Incisional con Clopidogrel [múltiplos del valor de la solución salina]

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulada (mg/kg)	Babuino 1	Babuino 2	Babuino 3
Línea base	0	n.a.	n.a.	n.a.
Solución salina	0	1	1	1
1	1	1,59	1,21	1,28
1,5	2,5	1,06	1	1,1
2,5	5	1,41	6,64	3,32
5	10	5,82	13,64	0,95
10	20	9,12	2,64	0,92

5 **Ventana Terapéutica y Clasificación BleedScore de GBR600:** En la Figura 10, los resultados del test de hemorragia por incisión del Estudio 1 y 2 y los tres estudios de clopidogrel se representan gráficamente contra las dosis de GBR600 y clopidogrel (las dosis se expresan como múltiplos de sus valores  $DE_{100}$  y se representan gráficamente en escala logarítmica).

10 GBR600, incluso a dosis mayores que 100 veces su valor  $DE_{100}$ , causa hemorragia a un nivel observado en clopidogrel sólo hasta 4 veces su  $DE_{100}$ . Inesperadamente, GBR600 tiene una ventana terapéutica de seguridad sin precedentes en términos de riesgo de hemorragia.

15 El único aumento clínicamente relevante en hemorragia observado en este estudio es un aumento en la hemorragia auto-limitante de cortes superficiales como se determina por los métodos de hemorragia del modelo y hemorragia incisional. Los animales se observan cuidadosamente durante un periodo de 48 horas después de la operación quirúrgica y no se detecta signo adicional alguno de hemorragia superficial tal como amoratamiento fácil, petequia o equimosis. Más importante es la ausencia de signos de hemorragia interna tales como hematoma, epistaxis, pérdida de sangre por boca, vagina, melena, hemorragia oftálmica, hematuria y hematemesis. La herida por operación no sangraba y se curaba normalmente.

20 Tanto clopidogrel como GBR600 tienen un registro de 1 en el esquema de registro BleedScore, como se muestra en la Tabla 29. Aparte de la hemorragia incrementada en las heridas superficiales, no se detecta ningún otro síntoma en los animales durante el experimento o durante un periodo de observación de 48 horas después de la conclusión de los estudios.

**Tabla 29. Determinación BleedScore para Clopidogrel y GBR600**

<b>Determinación de BleedScore</b>				
<b>Gravedad de la Hemorragia</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Registro</b>	<b>Clopidogrel</b>	<b>GBR600</b>
Hemorragia Superficial	Amoramiento fácil	1	0	0
	Hemorragia por pequeños cortes	1	1	1
	Petequia	1	0	0
	Equimosis	1	0	0
Hemorragia Interna	Hematoma	3	0	0
	Epistaxis	3	0	0
	Pérdida de sangre por boca, melena	3	0	
	Melena	3	0	0
	Hemorragia oftálmica	3	0	0
	Hematuria	3	0	0
	Hematemesis	3	0	0
Hemorragia Alarmante	Necesidad de Transfusión	6	0	0
	Intracraneal	6	0	0
	Amenazante para la vida	6	0	0
<b>BleedScore</b>			<b>1</b>	<b>1</b>

**Hallazgos de los Estudios de Eficacia y Seguridad:** Las Tablas 30-32 muestran el efecto de GBR600 sobre los niveles de vWF, niveles de Factor VIII, recuento de Glóbulos Blancos, concentración de Hemoglobina (Hb), recuento de Plaquetas (Plt), tiempo de Protrombina (PT) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (aPTT) en los estudios 1 a 3.

Con relación a los niveles de von Willebrand obtenidos en los Estudios 1 a 3, no se observa patrón alguno en el Estudio 1, pero en los Estudios 2 y 3 se observa una disminución clara en los niveles de von Willebrand. En el Estudio 2, en el que se utilizan dosis mucho mayores, el efecto es más pronunciado que en el Estudio 3, en el que se utilizan dosis relativamente bajas. En el estudio con un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado de control que no se fijaba a vWF, no se observa efecto alguno de los niveles von Willebrand. Este efecto y las implicaciones del mismo deberían monitorizarse cuidadosamente en estudios futuros. GBR600 no tenía un efecto acusado sobre los niveles de Factor VIII en todos los estudios.

Aunque se observa un aumento en WBC, este es un efecto conocido del procedimiento invasivo y está bien correlacionado con los resultados observados para el anticuerpo IgG4 monoclonal de control que no se fija a vWF y todos los restantes fármacos testados hasta ahora en este modelo. No puede observarse efecto acusado alguno sobre la concentración de hemoglobina causado por la infusión de GBR600. Como efecto de la infusión de GBR600 sobre el recuento de plaquetas, durante estos procedimientos las plaquetas se consumen dado que la deposición de las plaquetas es responsable de la oclusión de la arteria durante las CFRs. La inhibición eficaz de las CFRs disminuirá por tanto la cantidad de consumo de plaquetas. Esto explica el mayor consumo de plaquetas observado con el anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado de control, que no se fija a vWF, donde no se observa inhibición alguna de CFRs.

Parece no haber efecto acusado alguno de GBR600 sobre PT y aPTT, que son indicadores de la integridad de las proteínas de la coagulación. Se observan resultados similares para el anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado de control que no se fija a vWF.

Tabla 30. Estudio 1

	Línea base	Solución salina	0,03mg/kg	0,1mg/kg	0,3mg/kg	1,0mg/kg	10mg/kg
WBC x 10 <sup>9</sup> /l	7,48	6,92	7,89	9,32	11,57	12,29	11,52
RBC x 10 <sup>12</sup> /l	5,7	5,88	5,75	5,86	5,83	5,79	5,8
Hemoglobina g/dl	13,4	14,3	14,1	14,1	14,4	14	14
Hematocrito l/l	40,5	43,5	42,5	43,5	43,4	0,4	41,4
MCV fl	71,1	74,0	73,9	74,2	74,4	74,6	71,4
MCH pg	23,5	24,3	24,5	24,1	24,7	24,2	24,1
MCMC g/dl	33,1	32,9	33,2	32,4	33,2	32,4	33,8
plt x 10 <sup>9</sup> /l	306	249	234	236	245	257	262
neut x 10 <sup>9</sup> /l	3,46	3,32	4,35	5,92	8,16	8,89	8,44
lymph x 10 <sup>9</sup> /l	3,62	3,21	3,04	2,80	2,75	2,88	2,32
monocitos x 10 <sup>9</sup> /l	0,36	0,36	0,46	0,58	0,61	0,50	0,73
eosinófilos x 10 <sup>9</sup> /l	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03	0,01	0,02
basófilos x 10 <sup>9</sup> /l	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
PT	9	10	10	10,00	10	10	10
aPTT	42	42	44	43	42	42	45
F VIII	107	89	83	88	80	78	78
concentración de vWF	25	46	39	15	26	48	17
agregación, %	no	no	no	no	no	no	no

Tabla 31. Estudio 2

	Línea base	Solución salina	0,01mg/kg	0,03mg/kg	0,1mg/kg	0,3mg/kg	1,0mg/kg	10mg/kg
WBC x 10 <sup>9</sup> /l	11,98	12,42	12,49	11,89	11,14	10,91	11,01	13,92
RBC x 10 <sup>12</sup> /l	5,24	5,36	5,34	5,34	5,42	5,57	5,57	5,54
Hemoglobina g/dl	12,2	12,7	12,8	12,8	12,9	13,2	13,4	13,2
Hematocrito l/l	34,1	34,9	34,8	34,7	35,1	36,1	36,1	36,1
MCV fl	65,1	65,1	65,2	65,0	64,8	64,8	64,8	65,2
MCH pg	23,3	23,7	24,0	24,0	23,8	23,7	24,1	23,8
MCMC g/dl	35,8	36,4	36,8	36,9	36,8	36,6	37,1	36,6
plt x 10 <sup>9</sup> /l	313	281	276	281	287	283	283	268
neut x 10 <sup>9</sup> /l	9,37	9,44	9,12	8,60	8,03	7,98	8,15	11,33
lymph x 10 <sup>9</sup> /l	2,20	2,55	2,84	2,82	2,68	2,51	2,46	2,10
monocitos x 10 <sup>9</sup> /l	0,38	0,40	0,47	0,42	0,37	0,36	0,32	0,38

ES 2 495 092 T3

eosinófilos x 109/l	0,01	0,02	0,05	0,04	0,04	0,05	0,08	0,10
basófilos x 109/l	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
PT	9	9	9	9	9	9	9	9
aPTT	55	?>120	53	60	61	55	55	58
F VIII	49	56	48	54	54	56	58	68
concentración de vWF	34	31	28	21	16	14	14	10
agregación, %	no	no		no	no	no	no	no

Tabla 32. Estudio 3

	Línea base	Solución salina	0,005mg/kg	0,01mg/kg	0,02mg/kg	0,03mg/kg	0,04mg/kg	0,05mg/kg	0,06mg/kg	0,07mg/kg
WBC x 109/l	4,97	5,63	5,10	6,36	7,22	8,8	11,56	13,5	14,06	14,38
RBC x 1012/l	6,13	6,25	6,2	6,1	6,22	6,19	6,27	6,17	6,16	5,65
Hemoglobina g/dl	14,0	14,6	14,8	14,7	14,5	14,4	14,7	14,7	14,8	13,5
Hematocrito l/l	44,1	45,2	46,4	45,8	45,1	44,7	45,2	46,6	46,5	42,7
MCV fl	71,9	72,3	74,8	75,1	72,5	72,2	72,1	75,5	75,5	75,6
MCH pg	22,8	23,4	23,9	24,1	23,3	23,3	23,4	23,8	24,0	23,9
MCMC g/dl	31,7	32,3	31,9	32,1	32,2	32,2	32,5	31,5	31,8	31,6
plt x 109/l	373	331	327	342	342	334	360	321	318	286
neut x 109/l	3,21	3,83	3,11	4,13	5,26	6,85	9,73	11,80	12,36	12,80
lymph x 109/l	1,59	1,54	1,73	1,97	1,60	1,56	1,45	1,38	1,34	1,14
monocitos x 109/l	0,15	0,23	0,20	0,25	0,34	0,36	0,36	0,31	0,37	0,42
eosinófilos x 109/l	0,01	0,01	0,05	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01
basófilos x 109/l	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01
PT	9	9	8	8	9	9	9	9	9	10
aPTT	39	41	40	40	39	39	39	38	41	42
F VIII	84	79	80	88	80	85	82	80	85	81
concentración de vWF	53	50	48	51	46	44	42	35	36	35
agregación, %	no	no		no	no	no	no			no

5 GBR600 parece ser un inhibidor potente de la deposición de las plaquetas durante la trombosis arterial. La epinefrina no invertía la inhibición, como lo hace con clopidogrel. No se observa hemorragia adversa grave alguna con GBR600, aun cuando el fármaco se infunde a lo que realmente parece ser una dosis de hasta 250 veces la dosis eficaz. A estas dosis, la hemorragia medida por el modelo de hemorragia incisional producía resultados similares a clopidogrel infundido a 4 hasta 8 veces la dosis eficaz. GBR600 no tenía efecto alguno sobre las proteínas de la coagulación, como se muestra en los resultados de PT y aPTT. Sin embargo, existe una disminución

en los niveles de Factor von Willebrand. No se observa efecto claro alguno sobre los niveles de Factor VIII, sin embargo. Esto no precisa ser un problema, dado que la warfarina inhibe el sistema de coagulación por disminución de los niveles circulantes de las proteínas de la coagulación funcionales dependientes de la vitamina K. No se observó efecto inesperado alguno sobre los parámetros de Recuento Total de Glóbulos (WBC, Hb y Plt) en este estudio.

#### **Ejemplo 11: Estabilidad térmica de las variantes humanizadas de NMC-4**

La estabilidad térmica de las variantes humanizadas de NMC-4, del fragmento FAB de NMC-4 murino y de una NMC4-IgG1 quimérica se comparó utilizando medidas calorimétricas. Los perfiles de fusión de los anticuerpos monoclonales son característicos de sus isotipos (Garber y Demarest (2007), BBRC 355: 751-7); sin embargo, la temperatura de fusión en el punto medio del fragmento FAB puede identificarse fácilmente incluso en el contexto de una IgG de longitud total. Dicha fusión en el punto medio de la porción FAB se utilizó para monitorizar la estabilidad monoclonal de los candidatos humanizados.

Se llevaron a cabo medidas calorimétricas en un microcalorímetro de barrido diferencial VP-DSC (MicroCal, Northampton, Reino Unido). El volumen de células era 0,128 ml; la tasa de calentamiento era 1°C/min; y el exceso de presión se mantuvo a 64 psi. (441,3 kPa). Todos los fragmentos de proteínas se utilizaron a una concentración de 1-0,5 mg/ml (74 µM) en PBS (pH 7,4). La capacidad calorífica molar de cada proteína se estimó por comparación con muestras duplicadas que contenían el mismo tampón del que se había omitido la proteína. Las capacidades térmicas molares parciales y curvas de fusión se analizaron utilizando procedimientos estándar. Los termogramas se corrigieron por la línea base y la concentración se normalizó antes de ser analizada ulteriormente utilizando un modelo Non-Two State en el software Origin v7.0. Un ejemplo de los datos obtenidos para H14L10-IgG4 como se describe en el Ejemplo 3 se muestra en la Figura 12. El fragmento FAB murino de NMC-4 exhibe una sola transición a 74,7°C, mientras que la transición del fragmento FAB H14L10-IgG4 aparece a 81,1°C, lo que corresponde a una diferencia de estabilidad significativa (6,4°C). Para determinar la influencia de los dominios constantes de FAB humano, se preparó una quimera consistente en los dominios variables de NMC-4 murino injertados en la IgG1 humana (el isotipo humano más estable; Garber y Demarest (2007), BBRC 355:751-7). Los valores T<sub>m</sub> de FAB aparentes para H14L10-IgG4 y NMC4-IgG1 quimérico (79,1°C) exhiben todavía un aumento significativo de estabilidad para H14-L10 FAB (delta T<sub>m</sub> > 1°C).

#### **Ejemplo 12: Clonación de los genes codificantes de la cadena pesada (VH9) y la cadena ligera (VL9) de GBR600**

Los materiales y métodos utilizados para clonación de los genes codificantes de GBR600 eran los siguientes:

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

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

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

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

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

Cebadores: Operon, Colonia, Alemania

GLNPR107: TAACTAGTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTC

GLNPR108: AAGCTTACGGCTAGCTCACGACACCTGAAATGGAAG

GLNPR139: CCTCAGACAGTGGTTCAAAG

GLNPR 176 GCTAGCGCCACCATGGAGACAGACACAC

GLNPR 177 TAAGCTTCTATCATTACCCAGAGACAGGG

GLNPR 178 TAAGCTTCTATCAACTCTCCCCTGTTG

BGHREV: Proporcionado por Fasteris

Vectores TMC pCI-NMC4-VL9 (p156) y pCI-NMC4-VH9 (p158) proporcionados por Chromos. Qiaquick Gel extraction kit (Qiagen, Cat.-No.: 28706)

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

pcDNA3.1(-) (Invitrogen, Cat.-No.: V795-20)

pEF-Dest51[CD19] (RZPD, Cat.-No.: RZPDo839G0167-pEF-DEST51)

Secuenciación : Fasteris SA (Ginebra, Suiza)

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

Clonación del vector de expresión pEFcDNA3.1

5 El vector de expresión pEFcDNA se creó por reemplazamiento del promotor CMV de pcDNA 3.1(-) (Invitrogen) con el promotor EF1-alfa de pEF-DEST51. Para este propósito, el promotor EF1-alfa se amplificó utilizando los cebadores GLNPR107 y 108 utilizando PfuUltra (Stratagene, temperatura de reasociación 55°C, 30 ciclos). Los cebadores amplifican el promotor EF1-alfa completo y fijan un lado SpeI en el extremo 5' y un lado HindIII en el extremo 3' del fragmento amplificado. El amplicón PCR se clonó en pCR-romo (Invitrogen) y los clones se analizaron por una digestión con SpeI/HindIII. El fragmento SpeI/HindIII del clon #4 se cortó y se clonó en la cadena principal de pcDNA 3.1(-) que se digirió utilizando la misma combinación de enzimas y CIPed. Los clones se analizaron utilizando SpeI y HindIII y el clon #2 parecía ser positivo. Una segunda digestión con la cadena principal y la inserción confirmó ulteriormente el tamaño correcto del fragmento promotor.

Clonación de GBR600 en pEFcDNA

15 Se amplificó GBR600 VH9 utilizando Pfu Ultra (condiciones estándar, temperatura de reasociación 55°C, 30 ciclos) y los cebadores GLNPR176 y 177. El modelo era el vector de TMC p156. Se amplificó GBR600 VL9 utilizando los cebadores GLNPR176 y 178 como se describe para la cadena pesada. El modelo utilizado era el vector de TMC p158. Los cebadores añaden un sitio de restricción NheI 5' y un sitio de restricción HindIII 3' al amplicón respectivo. Los fragmentos PCR obtenidos se clonaron en pCR-romo y se analizaron por digestión de restricción utilizando NheI y HindIII. El clon #1 para la cadena ligera y el clon #3 para la cadena pesada se cortaron y se clonaron en pEFcDNA que se abrió utilizando las enzimas NheI y HindIII y CIPed. La digestión de restricción demostró que el clon #1 para la cadena ligera y el clon #6 para la cadena ligera contenían fragmentos del tamaño correcto. Estos dos clones se enviaron a Fasteris para control de la secuenciación como muestras GS256 y GS257. Los archivos de secuenciación se alinearon con secuencias de referencia. Debido a la mala calidad del DNA miniprep, la secuencia de la cadena pesada GS257 no pudo confirmarse al 100%. Los plásmidos que codificaban la cadena pesada VH9 de GBR600 (GS257) y la cadena ligera de GBR600 VL9 (GS256) se utilizaron para la preparación de Gigapreps. Las preparaciones plasmídicas se enviaron de nuevo para confirmación de la secuencia a Fasteris. Los nombres de las muestras esta vez eran GS265 para VH9 de la cadena pesada de GBR600 y GS264 para VL9 de la cadena ligera de GBR600. Debido a la mejor calidad del DNA, la identidad de la secuencia respecto a la secuencia de referencia pudo confirmarse para las cadenas pesada y ligera.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Glenmark Pharmaceuticals, S.A.

5 <120> Anticuerpos humanizados específicos para el factor von Willebrand.

<130> 16708/PCT

<160> 238

10 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 218

15 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> NMC-4 (cadena pesada del mAb murino)

20 <400> 1

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95  
 Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 115 120 125  
 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
 130 135 140  
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
 Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
 195 200 205  
 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 210 215

ES 2 495 092 T3

<210> 2  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> NMC-4 (cadena ligera del mAb murino)  
  
 10 <400> 2  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
 20 25 30  
  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Phe Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
 100 105 110  
  
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly  
 115 120 125  
  
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
 130 135 140  
  
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu  
 145 150 155 160  
  
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
 165 170 175  
  
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
 180 185 190  
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
 195 200 205

15 <210> 3  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 20 <220>  
 <223> VH de línea germinal humana, 4-59  
  
 <400> 3

ES 2 495 092 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser  
 65

5 <210> 4  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Anticuerpo Humano AAC18165.1  
 <400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Gly Tyr Arg Pro Gly Val Ala Ala His Ser Pro Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110

15 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20 <210> 5  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> VL de la línea germinal humana, 018

25 <400> 5

ES 2 495 092 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85

<210> 6  
<211> 107  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
10 <223>Anticuerpo Humano AAK94808

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<223> HDCDR1

<400> 7

25 Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly Val Asp  
1 5 10

<210> 8  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> HCDR2  
 <400> 8  
 10  
 Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 9  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> HCDR3  
 20  
 <400> 9  
 Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr  
 1 5 10  
 25 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> LCDR1  
 <400> 10  
 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Leu Asn  
 35 1 5 10  
 <210> 11  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> LCDR2  
 45 <400> 11  
 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
 1 5  
 50 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 55 <220>  
 <223> LCDR3  
 <400> 12  
 Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp Thr  
 60 1 5

ES 2 495 092 T3

<210> 13  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> artificial

5

<220>  
<223> H2

<400> 13

10

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

<210> 14  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> artificial

15

<220>  
<223> H4

20

<400> 14

ES 2 495 092 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15  
<211> 122  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
10 <223> H5

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 16  
<211> 122  
<212> PRT

ES 2 495 092 T3

<213> artificial

<220>

<223> H6

5

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

10

<210> 17

<211> 122

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> H7

<400> 17

ES 2 495 092 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 18  
<211> 122  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> H8

10 <400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 19  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> artificial

ES 2 495 092 T3

<220>  
<223> H9

5 <400> 19

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

<210> 20  
10 <211> 122  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
15 <223> H12

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr  
20 25 30  
Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 495 092 T3

35

40

45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 21  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> artificial

5

<220>  
<223> H13

10

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr  
20 25 30

Gly Trp Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 22  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> humano

20 <220>  
<221> H14  
<222> (1)..(122)

25 <400> 22

ES 2 495 092 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr  
20 25 30

Gly Trp Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 23  
<211> 107  
5 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> L5

10 <400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 24  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>

ES 2 495 092 T3

<223> L4

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> L6

15 <400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

20 <210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 495 092 T3

<220>  
<223> L7

<400> 26

5

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

<210> 27  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> artificial

10

<220>  
<223> L8

<400> 27

15

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

20

<210> 28  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> artificial

ES 2 495 092 T3

<220>  
<223> L9

5 <400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

10 <210> 29  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> L10

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

20 <210> 30  
<211> 107  
<212> PRT

ES 2 495 092 T3

<213> artificial

<220>

<223> L11

5

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Phe Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

10

<210> 31

<211> 6

<212> DNA

<213> artificial

15

<220>

<223> Elemento de transcripción

<220>

20

<221> característica mixta

<222> (2)..(2)

<223> n e s a, c, g, o t

<400> 31

25

cncaat 6

<210> 32

<211> 6

30

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Elemento de transcripción 1

35

<400> 32

aataaa 6

40

<210> 33

<211> 1602

<212> DNA

<213> artificial

45

<220>

<223> Clon IMAGE #4764579

ES 2 495 092 T3

<400> 33

```

ggcaccgagg gtttctgtcc tccacatca tggggtaac cgccatcctc gccctcctcc      60
tggctgttct ccaaggagtc tgtgccgagg tgcgcctgga gcagtctggg acagaggatga    120
aaaagccggg ggagtctctg aaaatctcct gtcaggcttc tggattcacc tttaccgact     180
actggatecg ctgggtgctc cagctgcccg ggcaaggcct ggagtggatg ggcttcatcg    240
atcgtcttga ctctaaaata agatataacc cgtccttcca aggccaagtc accatgtcag     300
ccgacacgct gataaccgcc gtctacctgc agtggagccg cctgaaggcc tcggacaccg    360
gcatctatta ttgtgctgacc tcggatacac ctctggactc ttactccttt gaattttggg    420
gccagggagg cctcgtcatc gtctcctcag cctccacca gggcccatcg gtcttcccc      480
tggcacctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggatcaagg    540
actacttccc cgaaccggtg acgggtgtcat ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc    600
acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg    660
tgcctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca     720
acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac    780
cgtgcccgac acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaccaca    840
aggacacctt catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc     900
acgaagacc tgaggatcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca    960
agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg   1020
tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc   1080
tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg   1140
tgtacacctt gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc    1200
tggatcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg   1260
agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca    1320
gcaagctcac cgtggacaag agcagggtgc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga    1380
tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaata   1440
gagtgcgacg gccggcaagc ccccgctccc cgggctctcg cggctgcacg aggatgcttg   1500
gcacgtacc cctgtacata cttcccgggc gccagcatg gaaataaagc acccagcgt     1560
gccctgggcc cctgcgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa                        1602

```

5  
 <210> 34  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> artificial

10  
 <220>  
 <223> NMC-VH-coRI-F

15  
 <400> 34  
 gacgcgaatt cgcaggatgca gctgaaggag agc 33

20  
 <210> 35  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> NMC-VH-gG4IgG1-R

<400> 35  
 5 cggatgggcc cttggtggaa gcgctgctca cggtcacgct ggt 43  
 <210> 36  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> hlgG-F  
 <400> 36  
 15 gcttcacca agggcccatc cg 22  
 <210> 37  
 <211> 24  
 20 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> hlgG-R  
 25 <400> 37  
 cagagacagg gagaggctct tctg 24  
 30 <210> 38  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 35 <220>  
 <223> hlgG BamH1-R  
 <400> 38  
 40 attagatcc ttatcatta cccagagaca gggagaggct 40  
 <210> 39  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 45 <213> artificial  
 <220>  
 <223> hFc-L235E-F  
 50 <400> 39  
 ctcgaggggg gaccgtcagt ctctcttt 29  
 <210> 40  
 55 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 60 <223> IgG1-L235E-R  
 <400> 40  
 aagaggaaga ctgacgttcc cccctcgag 29  
 65 <210> 41

ES 2 495 092 T3

<211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 5 <220>  
 <223> CH2-C1q(-)-F  
 <400> 41  
 10 ggcgtacgcg tgcgcggtct ccaacaaagc 30  
 <210> 42  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 15 <213> artificial  
 <220>  
 <223> CH2-C1q(-)-R  
 20 <400> 42  
 ccgcgcacgc gtacgccttg ccattcagcc a 31  
 <210> 43  
 25 <211> 96  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 30 <223> 4-59 conductora-HindIII-NMC-4  
 <400> 43  
**attaagcttg ccgccacat gaaacatctg tggttcttcc ttctcctggt ggcagctccc 60**  
**agggtgggtcc tgtcccaggt gcagctgaag gagagc 96**  
 35 <210> 44  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> IgG1-BamHI-R  
 <400> 44  
 45 taaggatcct tatcattac ccggagacag ggagag 36  
 <210> 45  
 <211> 34  
 50 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> NMC-VL-EcoRI-F  
 55 <400> 45  
 gacgcgaatt cggacatcca gatgaccag agcc 34  
 60 <210> 46  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> NMC-VL-Kappa-R  
 <400> 46  
 5 gaagacagat ggtgcagcca cagttcgctt cacctccagc ttggtgcc 48  
 <210> 47  
 <211> 26  
 10 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Kappa-F  
 15 <400> 47  
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtctt 26  
 20 <210> 48  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 25 <220>  
 <223> Kappa-BamHI-R  
 <400> 48  
 30 aattcggatc ctactaaca ctctcccctg ttgaagctct t 41  
 <210> 49  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 35 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Hind III-Ko-AJW-F  
 40 <400> 49  
 gttaagcttg ccgccacat ggatttggg ctgattttt ttattgt 48  
 <210> 50  
 45 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 50 <223> HuFab-H-R  
 <400> 50  
 gaatgggccc ttggtggaag cggaggaaac ggtcaccagg gta 43  
 55 <210> 51  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 60 <220>  
 <223> XhoI-Ko-AJW-F  
 <400> 51  
 65 aatctcgagg ccgccacat gagtgtgccc actcaggcc tgg 43

ES 2 495 092 T3

<210> 52  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> NMC-4 VL  
 10 <400> 52  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Leu  
 20 25 30  
  
 Tyr Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Phe Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
  
 15 <210> 53  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 20 <220>  
 <223> NMC-4 VH  
  
 <400> 53  
  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
  
 Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
  
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
  
 25 Ser  
 65  
  
 <210> 54  
 <211> 98  
 <212> DNA  
 30 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> 4-59 huNMC-F  
  
 35 <400> 54  
  
 gttaagcttg ccgccaccat gaaacatctg tggttcttcc ttctcctggt ggcagctccc 60  
 aggtgggtcc tgtcccaggt gcagctgcag gaatccgg 98

ES 2 495 092 T3

<210> 55  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> artificial  
5  
<220>  
<223> Hu-VH-R  
  
<400> 55  
10 ggatgggccc ttggtggaag cggaggaaac ggtcaccgagg gta 43  
  
<210> 56  
<211> 26  
15 <212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> pcDNA6-F  
20  
<400> 56  
  
cactgcttac tggcttatcg aaatta 26  
  
25 <210> 57  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> artificial  
  
30 <220>  
<223> VH-93A-For  
  
<400> 57  
35 gacaccgctg ttactactg cgctcgtgac cgggctgact 40  
  
<210> 58  
<211> 40  
<212> DNA  
40 <213> artificial  
  
<220>  
<223> VH-V93A-Rev  
  
45 <400> 58  
  
agtcagccgg gtcaccgaccg cagtagtaaa cagcgggtgc 40  
  
<210> 59  
<211> 30  
<212> DNA  
50 <213> artificial  
  
<220>  
<223> HC-L67V-F  
  
<400> 59  
  
60 ctgaaatccc gtgttaccat ctccaaagac 30  
  
<210> 60  
<211> 30  
<212> DNA  
65 <213> artificial  
  
<220>

<223> HC-L67V-R  
 <400> 60

5 gtccttgag atggaacac gggattcag 30  
 <210> 61  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 10 <213> artificial  
 <220>  
 <223> HC-N73T-F

15 <400> 61  
 accatctcca aagacacctc caaaaac 27  
 <210> 62  
 20 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> HC-N73T-R  
 <220>  
 <221> HC-N73T-R  
 <222> (1)..(27)  
 30 <400> 62  
 gttttggag gtgtcttgg agatggt 27

35 <210> 63  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> artificial

40 <220>  
 <223> HC-V78F-F  
 <400> 63

45 aactcaaaa accagtctc cctgaaac 28  
 <210> 64  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 50 <213> artificial  
 <220>  
 <223> HC-V78F-R

55 <400> 64  
 gtttcagga gaactggtt ttgagtt 28  
 <210> 65  
 60 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 65 <223> HC-K71V-F(H9)

<400> 65  
 cttaccatct ccgtagacaa ctccaaaaac 30

5 <210> 66  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> HC-K71V-R  
 <400> 66

15 gttttggag ttgtctacgg agatggaag 30  
 <210> 67  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 20 <213> artificial  
 <220>  
 <223> hu-VH-K71V-F(H9)

25 <400> 67  
 cgtgttacca tctccgtaga cacctccaaa 30  
 <210> 68  
 30 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 35 <223> hu-VH-K71V-R(H9)  
 <400> 68

40 tttggagtg tctacggaga tgtaacacg 30  
 <210> 69  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> Fab-L-For  
 <400> 69

50 atacatatgg acatccagat gaccagagc 30  
 <210> 70  
 <211> 36  
 55 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Fab-L-Rev

60 <400> 70  
 agactcgagt tatcaacct ctcccctggt gaagct 36

65 <210> 71  
 <211> 34

<212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <223> NMC4-VL-EcoRI-F  
  
 <400> 71  
  
 gacgcgaatt cggacatcca gatgacccag agcc 34  
 10  
 <210> 72  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> 5'-IRES  
  
 <400> 72  
 20  
 agctggttta gtga 14  
  
 <210> 73  
 <211> 17  
 25 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> 3'-IRES  
 30  
 <400> 73  
  
 caagcggctt cggccag 17  
 35 <210> 74  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> LC-Y49F-F  
  
 <400> 74  
 45 ccaagctgct gatcttctac acca 24  
  
 <210> 75  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 50 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> LC-Y49F-R  
 55 <400> 75  
  
 tgggtgtagaa gatcagcagc ttgg 24  
 60  
 <210> 76  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 65 <223> LC-F83I-F

ES 2 495 092 T3

<400> 76  
cagcccgagg acatcgccac ctactactgc 30

5 <210> 77  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> artificial

10 <220>  
<223> LC-F83I-R  
  
<400> 77

15 gcagtagtag gtggcgatgt cctcgggctg 30  
  
<210> 78  
<211> 30  
<212> DNA  
20 <213> artificial  
  
<220>  
<223> LC-P44V-F

25 <400> 78  
  
aagcccggca aggccgtcaa gctgctgatc 30  
  
<210> 79  
30 <211> 30  
<212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
35 <223> LC-P44V-R  
  
<400> 79

40 gatcagcagc ttgacggcct tgccgggctt 30  
  
<210> 80  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> artificial

45 <220>  
<223> LC-F49Y-F  
  
<400> 80

50 gccgtcaagc tgctgatcta ctacaccag 29  
  
<210> 81  
<211> 29  
55 <212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> LC-F49Y-R

60 <400> 81  
  
ctggtgtagt agatcagcag cttgacggc 29

65 <210> 82  
<211> 30

<212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <223> LC-Y71F-F  
  
 <400> 82  
  
 ggacagcggca ccgacttcac cctgaccatc 30  
 10  
 <210> 83  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> LC-Y71F-R  
  
 <400> 83  
 20  
 gatggtcagg gtgaagtcgg tgccgctgcc 30  
  
 <210> 84  
 <211> 35  
 25 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> HuLC-V44P, F49Y-F  
 30  
 <400> 84  
  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accag 35  
 35  
 <210> 85  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 40  
 <220>  
 <223> HuLC-V44P, F49Y-R  
  
 <400> 85  
 45 ctggtgtagt agatcagcag cttgggggcc ttgcc 35  
  
 <210> 86  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 50 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> huL10-F  
 55  
 <400> 86  
  
 accatcacct gccaaGCCag ccaggacatc agcaactacc tgaactgg 48  
 60  
 <210> 87  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 65  
 <220>  
 <223> huL10-R

ES 2 495 092 T3

<400> 87

ccagttcagg tagtgctga tgcctggct ggctggcag gtgatggt 48

5 <210> 88  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> artificial

10 <220>  
<223> huL11-F

<400> 88

15 cccaagctgc tgatctacga cgccagcaac ctggaaaccg gcgtgccc 48

<210> 89  
<211> 48  
<212> DNA

20 <213> artificial

<220>  
<223> huL11-R

25 <400> 89

gggcacgccg gttccaggt tgctggcgtc gtagatcagc agctggg 48

<210> 90  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> artificial

30 <220>  
<223> huH12-F

<400> 90

gtttccggtg gctccatctc cgactacggt gttgactgga 40

40 <210> 91  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> artificial

45 <220>  
<223> huH12-R

<400> 91

50 tccagtcaac accgtagtgc gagatggagc caccggaac 40

<210> 92  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> artificial

55 <220>  
<223> huH13-F

60 <400> 92

gtttccggtg gctccatctc cgatacgggt gggactggat ccgtcag 47

65 <210> 93  
<211> 48

ES 2 495 092 T3

<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
5 <223> huH13-R

<400> 93

ctgcaggatc cagtcccaac cgtagtcgga gatggagcca ccggaaac 48

10 <210> 94  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> artificial

15 <220>  
<223> huH14-F

<400> 94

20 gttccaccga ctacaacccc tctctgaaat cccgt 35

<210> 95  
<211> 35  
25 <212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> huH14-R

30 <400> 95

acgggatttc agagaggggt tgtagtcggt ggaac 35

35 <210> 96  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> artificial

40 <220>  
<223> huH15-F

<400> 96

45 gtttccggtg gctccatctc ctctactat tggctctgga tccgtcag 48

<210> 97  
<211> 48  
<212> DNA  
50 <213> artificial

<220>  
<223> huH15-R

55 <400> 97

ctgacggatc caggaccaat agtaggagga gatggagcca ccggaaac 48

60 <210> 98  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
65 <223> huH16-F

ES 2 495 092 T3

<400> 98

gaatggatcg gttatatcta ttattccggt tccaccaact acaaccctc t 51

5 <210> 99  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> artificial

10 <220>  
<223> huH16-R

<400> 99

15 agaggggttg tagttgggg aaccggaata atagatataa ccgatccatt c 51

<210> 100  
<211> 42  
<212> DNA

20 <213> artificial

<220>  
<223> IgKLF

25 <400> 100

cctatctcga gaagctcca ccatggagac agacacactc ct 42

<210> 101

30 <211> 55  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> IgKHnmcR

35 <400> 101

accgggaccg gattcctgca gctgcacctg tccagtggaa cctggaacct agagc 55

40 <210> 102  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> artificial

45 <220>  
<223> 14VHF

<400> 102

50 caggtgcagc tgcaggaatc cgttccg 27

<210> 103  
<211> 42

55 <212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> 14VHR

60 <400> 103

cctatgcggc cgcgggccct tgggtggaagc ggaggaaacg gt 42

65 <210> 104  
<211> 55

<212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <223> IgKLNMCRCR  
  
 <400> 104  
  
 gctgctgggg ctctgggtca tctggatgct tccagtggaa cctggaaccc agagc 55  
 10  
 <210> 105  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> 10VLF  
  
 <400> 105  
 20  
 gacatccaga tgaccagag cc 22  
  
 <210> 106  
 <211> 47  
 25 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> hKcR  
 30  
 <400> 106  
  
 cctatgcggc cgcggtatct atcaaacactc tcccctgtg aagctct 47  
 35  
 <210> 107  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Secuencia Ig conductora  
  
 <400> 107  
  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15  
  
 Gly Ser Thr Gly Asp  
 45 20  
  
 <210> 108  
 <211> 973  
 <212> DNA  
 50 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> Clon I.M.A.G.E ar#4704496  
 55  
 <400> 108

ES 2 495 092 T3

gatcaggact cctcagttca ctttctcaca atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg 60  
 ctaatgctct ggggccagg atccagtggg gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc 120  
 ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc atctcctgca ggtctactca aagcctcgta 180  
 tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg 240  
 cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac tctggggctcc cagacagatt cagcggcagt 300  
 gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc accagggtgg aggctgagga tgttgggggt 360  
 tatttctgca tgcagggtac aactggccg tccacttttg gccaggggac caagctggag 420  
 atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg 480  
 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 540  
 gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag 600  
 caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac 660  
 tacgagaac acaagtcta cgccctcgaa gtcaccatc agggcctgag ctcgcccgtc 720  
 acaaagagct tcaacagggg agagtgttag agggagaagt gccccacct gtcctcagt 780  
 tccagcctga cccctccca tcctttggcc tctgaccctt tttccacagg ggacctacc 840  
 ctattgcggt cctccagctc atctttcacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaatt 900  
 atgctaattg tggaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttcaaaaaa aaaaaaaaaa 960  
 aaaaaaaaaa aaa 973

<210> 109  
 <211> 19  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Secuencia conductora de la línea germinal humana 4-59 VH

<400> 109

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu ser

15 <210> 110  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> H15 CDRH1

<400> 110

Gly Gly ser Ile Ser ser Tyr Tyr Trp Ser  
 25 1 5 10

<210> 111  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 30 <213> artificial

<220>  
 <223> H14 CDRH1

35 <400> 111

Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr Gly Trp Asp  
 1 5 10

5 <210> 112  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> Vwf-A1-For  
 <400> 112  
 cccaggaatt cctcggaacc gcgttgcac 29  
 15 <210> 113  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> VWF-A1-Rev  
 <400> 113  
 25 ccgatgcggc cgctcacctc ttgggcccca g 31  
 <210> 114  
 <211> 34  
 30 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Rat-VWF-AI-F  
 35 <400> 114  
 agcgaattcc cccgaacccc cctgcacaa ctc 34  
 40 <210> 115  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> Rat-WPVWF-AI-R  
 <400> 115  
 50 agtgcgcccg cttatcacct tttgggtcct ggtgatgaaa cc 42  
 <210> 116  
 <211> 426  
 <212> DNA  
 55 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo Humano AAC18165.1 (número de acceso de mRNA AF062129.1)  
 60 <400> 116

ES 2 495 092 T3

atgaaacatc tgtggttctt ctttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60  
 gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120  
 tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tactactgga gctggatccg gcagcccca 180  
 gggaaaggac tggagtggat tgggtatatc tattacagtg ggagcaccaa ctacaacccc 240  
 tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300  
 ctgagctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattact gtgagagagg ctacagaccg 360  
 ggggtagctg cccacagccc atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420  
 tcaggg 426

<210> 117  
 <211> 322  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo Humano AAK94808 (mRNA)

<400> 117

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc aggcgagtca ggacattagc aactatntaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tatgataatc tccctctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 118  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> línea germinal humana 018 CDR-L2

<400> 118

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

<210> 119  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> VH4-59 CDR H2

<400> 119

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 120  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> L5 DNA

ES 2 495 092 T3

<400> 120

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60  
 atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc tcaagctgct gatcttctac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccctggac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

5

<210> 121  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> artificial

10

<220>  
 <223> L4 (DNA)

<400> 121

15

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60  
 atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatcttctac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccctggac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 122  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> artificial

20

<220>  
 <223> L6 (DNA)

25

<400> 122

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60  
 atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc tcaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccctggac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 123  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> artificial

30

<220>  
 <223> L7 (DNA)

35

<400> 123

ES 2 495 092 T3

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60  
 atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccg tcaagctgct gatcttctac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccttggac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 124  
 <211> 321  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> L8 (DNA)

<400> 124

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60  
 atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccttggac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

15 <210> 125  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> L9 (DNA)

<400> 125

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60  
 atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccttggac cttcggccag 300  
 25 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 126  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 30 <213> artificial

<220>  
 <223> L10 (DNA)

<400> 126

ES 2 495 092 T3

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggca cgcggtgacc 60  
 atcacctgcc aagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgcctggac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 127  
 <211> 321  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 10 <223> L11 (DNA)  
 <400> 127

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggca cgcggtgacc 60  
 atcacctgcc aagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagcaacc tggaaaccgg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgcctggac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

15 <210> 128  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> H2 (DNA)  
 <400> 128

cagggtcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccggttt ctccctgacc gactacgggtg ttgactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acggttcac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtct taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca ggtctccctg 240  
 aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgttcg tgaccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc agggtacctc cctgaccggt 360

25 tcctccgct 369

<210> 129  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 30 <213> artificial

<220>  
 <223> H4 (DNA)

35 <400> 129

ES 2 495 092 T3

caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggtatg atctggggtg acggttccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtct taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca ggtctccctg 240  
 aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgacccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc agggtacctc cctgaccgtt 360  
 tcctccgct 369  
 <210> 130  
 <211> 369  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> H5 (DNA)  
 10 <400> 130  
 caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggtatg atctggggtg acggttccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca ggtctccctg 240  
 aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgacccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc agggtacctc cctgaccgtt 360  
 tcctccgct 369  
 15 <210> 131  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> H6 (DNA)  
 <400> 131  
 caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggtatg atctggggtg acggttccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtct taccatctcc gtagacaact ccaaaaacca ggtctccctg 240  
 aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgacccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc agggtacctc cctgaccgtt 360  
 25 tcctccgct 369  
 <210> 132  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 30 <213> artificial  
 <220>  
 <223> H7 (DNA)  
 35 <400> 132

ES 2 495 092 T3

	caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
	acctgcaccg tttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg	120
	ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac	180
	tccgctctga aatcccgtct taccatctcc aaagacacct ccaaaaacca ggtctccctg	240
	aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgttcg tgaccggct	300
	gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggttacctc cctgaccgtt	360
	tcctccgct	369
5	<210> 133 <211> 369 <212> DNA <213> artificial	
10	<220> <223> H8 (DNA)	
	<400> 133	
	caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
	acctgcaccg tttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg	120
	ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac	180
	tccgctctga aatcccgtct taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca gttctccctg	240
	aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgttcg tgaccggct	300
15	gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggttacctc cctgaccgtt	360
	tcctccgct	369
20	<210> 134 <211> 369 <212> DNA <213> artificial	
	<220> <223> H9 (DNA)	
25	<400> 134	
	caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
	acctgcaccg tttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg	120
	ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac	180
	tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg	240
	aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggct	300
	gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggttacctc cgtgaccgtt	360
	tcctccgct	369
30	<210> 135 <211> 369 <212> DNA <213> artificial	
35	<220> <223> H12 (DNA)	
	<400> 135	

ES 2 495 092 T3

cagggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctgggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccgggtg ctccatctcc gactacgggtg ttgactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acgggtccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg 240  
 aaactgtcct ccggtaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgacccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactgggggtc aggggtaccct cgtgaccggt 360  
 tcctccgct 369

<210> 136  
 <211> 369  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> H13 (DNA)

<400> 136

cagggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctgggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccgggtg ctccatctcc gactacgggtt gggactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acgggtccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg 240  
 aaactgtcct ccggtaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgacccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactgggggtc aggggtaccct cgtgaccggt 360  
 tcctccgct 369

15 <210> 137  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> H14 (DNA)

<400> 137

25 cagggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctgggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccgggtg ctccatctcc gactacgggtt gggactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acgggtccac cgactacaac 180  
 ccctctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg 240  
 aaactgtcct ccggtaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgacccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactgggggtc aggggtaccct cgtgaccggt 360  
 tcctccgct 369

30 <210> 138  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> H15 (DNA)

35 <400> 138

ES 2 495 092 T3

caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctgggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccgggtg ctccatctcc tcctactatt ggtcctggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acgggtccac cgactacaac 180  
 ccctctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg 240  
 aaactgtcct ccggtaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccgggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactgggggc aggggtaccct cgtgaccgtt 360  
 tcctccgct 369  
 <210> 139  
 <211> 369  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> H16 (DNA)  
 10 <400> 139  
 caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctgggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg tttccgggtg ctccatctcc tcctactatt ggtcctggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctattatt ccgggtccac caactacaac 180  
 ccctctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg 240  
 aaactgtcct ccggtaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccgggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactgggggc aggggtaccct cgtgaccgtt 360  
 tcctccgct 369  
 15 <210> 140  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> VL-conductora (DNA)  
 <400> 140  
 25 atggagacag acacactct gctatgggta ctgctgctct ggggtccagg ttccactgga 60  
 <210> 141  
 <211> 321  
 30 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Región constante kappa (DNA)  
 35 <400> 141  
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccccat ctgatgagca gttgaaatct 60  
 ggaactgcct ctgtgtgtg cctgtgtaac aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120  
 tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180  
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240  
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300  
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

ES 2 495 092 T3

<210> 142  
 <211> 78  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VH-conductora (DNA)  
 <400> 142  
 10  
 atgaaacatc tgtggttctt ctttctcctg gtggcagcta tgaaacatct gtggttcttc 60  
 ctttctcctg tggcagct 78  
 <210> 143  
 <211> 993  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Región constante de IgG1(DNA)  
 20  
 <400> 143  
 tccaccaagg gcccatccgt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 60  
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcatgg 120  
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 180  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggac ccagacctac 240  
 atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 300  
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcga ggggggaccg 360  
 tcagtcttcc ttttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 420  
 gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 480  
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 540  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggcg 600  
 tacgcgtgcg cggctctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 660  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggatgagctg 720  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 780  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 840  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900  
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 960  
 aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga taa 993  
 25 <210> 144  
 <211> 997  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> Región constante de IgG4 (DNA)  
 <220>  
 <221> Región constante de IgG4 (DNA)  
 35 <222> (1)..(997)  
 <400> 144

ES 2 495 092 T3

tccaccaagg gccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 60  
 acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 120  
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 180  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac 240  
 acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagtccaaa 300  
 tatggtcccc catgcccatac atgcccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc 360  
 ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420  
 gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 480  
 gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 540  
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600  
 aaggctctca acaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 660  
 cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac 720  
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780  
 gagagcaatg ggacagccga gaacaactac aagaccacgc ctccctgtgct ggactccgac 840  
 ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcagggtggca ggaggggaat 900  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 960  
 tccctgtctc tgggtaaag ataggatccg cggccgc 997

5 <210> 145  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> H15  
 <400> 145

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
 100 105 110

15 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

ES 2 495 092 T3

<210> 146  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> H16

<400> 146

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

<210> 147  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> VH4 (4-04, región marco 1)

<400> 147

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser  
 20 25

25 <210> 148  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> VH4 (4-04, región marco 2)

<400> 148

35 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 149

ES 2 495 092 T3

<211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> VH4 (4-04, región marco 3)

<400> 149

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

10 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 150  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial

<220>  
 <223> VH4 (4-28, región marco 1)

20 <400> 150

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser  
 20 25

25 <210> 151  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 30 <223> VH4 (4-28, región marco 2)

<400> 151

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

35 <210> 152  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 40 <223> VH4 (4-28, región marco 3)

<400> 152

45 Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

50 <210> 153  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial

ES 2 495 092 T3

<220>

<223> VH4 (4-30.1, región marco 1)

<400> 153

5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20 25

<210> 154

<211> 14

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> VH4 (4-30.1, región marco 2)

15

<400> 154

Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

20

<210> 155

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> VH4 (4-30.1, región marco 3)

<400> 155

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
1 5 10 15

30

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 156

<211> 25

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> VH4 (4-30.2, región marco 1)

40

<400> 156

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser  
20 25

<210> 157

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

50

<220>

<223> VH4 (4-30.2, región marco 2)

<400> 157

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

5 <210> 158  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> VH4 (4-30.2, región marco 3)

<400> 158

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

15 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 159  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VH4 (4-30.4, región marco 1)

<400> 159

25 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
 20 25

30 <210> 160  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial

35 <220>  
 <223> VH4 (4-30.4, región marco 2)

<400> 160

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

40 <210> 161  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> VH4 (4-30.4, región marco 3)

<400> 161

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

50 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

ES 2 495 092 T3

<210> 162  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VH4 (4-31, región marco 1)  
 <400> 162  
 10  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
 20 25  
 <210> 163  
 <211> 14  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> VH4 (4-31, región marco 2)  
 20 <400> 163  
 Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10  
 25 <210> 164  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> VH4 (4-31, región marco 3)  
 <400> 164  
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15  
 35 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
 <210> 165  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 40 <213> artificial  
 <220>  
 <223> VH4 (4-34, región marco 1)  
 45 <400> 165  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr  
 20 25  
 50 <210> 166  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>

<223> VH4 (4-34, región marco 2)

5 <400> 166

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 167

10 <211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> VH4 (4-34, región marco 3)

<400> 167

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

20

<210> 168

<211> 25

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> VH4 (4-39, región marco 1)

<400> 168

30

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
 20 25

<210> 169

<211> 14

35 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> VH4 (4-39, región marco 2)

40

<400> 169

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

45 <210> 170

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

50 <220>

<223> VH4 (4-39, región marco 3)

<400> 170

ES 2 495 092 T3

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

5 <210> 171  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> VH4 (4-59, región marco 1)

<400> 171

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
 20 25

15 <210> 172  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VH4 (4-59, región marco 2)

<400> 172

25 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

30 <210> 173  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> VH4 (4-59, región marco 3)

35 <400> 173

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

40 <210> 174  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> VH4 (4-61, región marco 1)

<400> 174

ES 2 495 092 T3

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
 20 25

5 <210> 175  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> VH4 (4-61, región marco 2)  
 <400> 175

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

15 <210> 176  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VH4 (4-61, región marco 3)  
 <400> 176

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

25 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

30 <210> 177  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> VH4 (4-b, región marco 1)  
 35 <400> 177

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser  
 20 25

40 <210> 178  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> VH4 (4-b, región marco 2)  
 <400> 178

ES 2 495 092 T3

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 179  
 <211> 32  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 10 <223> VH4 (4-b, región marco 3)  
 <400> 179

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

15 <210> 180  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VK1 (012, región marco 1)  
 <400> 180

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 181  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> artificial

<220>  
 <223> VK1 (012, región marco 2)

35 <400> 181

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 182  
 40 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 45 <223> VK1 (012 , región marco 3)

<400> 182

ES 2 495 092 T3

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

5 <210> 183  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> VK1 (02, región marco 1)  
 <400> 183

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

15 <210> 184  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VK1 (02, región marco 2)  
 <400> 184

25 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

30 <210> 185  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> VK1 (02 , región marco 3)  
 35 <400> 185

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

40 <210> 186  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> VK1 (AnticuerpoAAK94808 derivado de 018 , región marco 1)  
 <400> 186

ES 2 495 092 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

5 <210> 187  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> VK1 (AnticuerpoAAK94808 derivado de 018 , región marco 2)  
 <400> 187

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

15 <210> 188  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> VK1 (AnticuerpoAAK94808 derivado de 018 , región marco 3)  
 <400> 188

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

25 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 30 <210> 189  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> VK1 (08, región marco 1)  
 35 <400> 189

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

40 <210> 190  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> VK1 (08, región marco 2)  
 <400> 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

50

ES 2 495 092 T3

<210> 191  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> VK1 (08 , región marco 3)  
 <400> 191  
 10  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 <210> 192  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> VK1 (A20, región marco 1)  
 20  
 <400> 192  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20  
 25 <210> 193  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> VK1 (A20, región marco 2)  
 <400> 193  
 35 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 194  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> VK1 (A20, región marco 3)  
 45 <400> 194  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 50 <210> 195  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>

<223> VK1 (A30, región marco 1)

5 <400> 195

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 196

10 <211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> VK1 (A30, región marco 2)

<400> 196

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

20

<210> 197

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> VK1 (A30, región marco 3)

<400> 197

30

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 198

<211> 23

35 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> VK1 (L14, región marco 1)

40

<400> 198

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

45 <210> 199

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

50 <220>

<223> VK1 (L14, región marco 2)

ES 2 495 092 T3

<400> 199

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 200  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> VK1 (L14, región marco 3)

<400> 200

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

15 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 201  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 20 <213> artificial

<220>  
 <223> VK1 (L1, región marco 1)

25 <400> 201

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 202  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 35 <223> VK1 (L1, región marco 2)

<400> 202

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

40 <210> 203  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> VK1 (L1, región marco 3)

<400> 203

50 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 204  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> VK1 (L15, región marco 1)  
  
 10 <400> 204  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20  
  
 <210> 205  
 15 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 20 <223> VK1 (L15, región marco 2)  
  
 <400> 205  
  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 25  
 <210> 206  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 30  
 <220>  
 <223> VK1 (L15, región marco 3)  
  
 <400> 206  
 35  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
  
 <210> 207  
 <211> 23  
 40 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> VK1 (L4, región marco 1)  
 45  
 <400> 207  
  
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20  
 50 <210> 208  
 <211> 15  
 <212> PRT

<213> artificial

<220>  
<223> VK1 (L4, región marco 2)

5 <400> 208

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

10 <210> 209  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> VK1 (L4 , región marco 3)

<400> 209

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

20 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 210  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> artificial

25 <220>  
<223> VK1 (L18, región marco 1)

30 <400> 210

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

35 <210> 211  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
40 <223> VK1 (L18, región marco 2)

<400> 211

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

45 <210> 212  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> artificial

50 <220>  
<223> VK1 (L18, región marco 3)

<400> 212

55

ES 2 495 092 T3

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

5 <210> 213  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> VK1 (L5, región marco 1)  
 <400> 213

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

15 <210> 214  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VK1 (L5, región marco 2)  
 <400> 214

25 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

30 <210> 215  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> VK1 (L5, región marco 3)  
 35 <400> 215

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

40 <210> 216  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> VK1 (L19, región marco 1)  
 <400> 216

ES 2 495 092 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

5 <210> 217  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> VK1 (L19, región marco 2)  
 <400> 217

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

15 <210> 218  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VK1 (L19 , región marco 3)  
 <400> 218

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

25 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

30 <210> 219  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> VK1 (L8, región marco 1)  
 35 <400> 219

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

40 <210> 220  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> VK1 (L8, región marco 2)  
 <400> 220

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

50 <210> 221

ES 2 495 092 T3

<211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> VK1 (L8, región marco 3)

<400> 221

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

10 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 222  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial

<220>  
 <223> VK1 (L23, región marco 1)

20 <400> 222

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

25 <210> 223  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 30 <223> VK1 (L12, región marco 2)

<400> 223

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr  
 1 5 10 15

35 <210> 224  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 40 <223> VK1 (L23 , región marco 3)

<400> 224

45 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

50 <210> 225  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

ES 2 495 092 T3

<220>

<223> VK1 (L9, región marco 1)

<400> 225

5

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 226

<211> 15

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> VK1 (L9, región marco 2)

15

<400> 226

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

20

<210> 227

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> VK1 (L9, región marco 3)

<400> 227

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

30

Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 228

<211> 23

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> VK1 (L24, región marco 1)

40

<400> 228

Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Thr Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys  
20

<210> 229

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

50

<220>

<223> VK1 (L24, región marco 2)

<400> 229

ES 2 495 092 T3

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 230  
 5 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> VK1 (L24, región marco 3)  
 <400> 230  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 15 Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 <210> 231  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 20 <213> artificial  
 <220>  
 <223> VK1 (L11, región marco 1)  
 25 <400> 231  
 Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20  
 <210> 232  
 30 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 35 <223> VK1 (L11, región marco 2)  
 <400> 232  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 40 <210> 233  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> VK1 (L11, región marco 3)  
 <400> 233  
 50 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 <210> 234

ES 2 495 092 T3

<211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> VK1 (L12, región marco 1)  
 <400> 234

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln ser Pro ser Thr Leu ser Ala ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

15 <210> 235  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> VK1 (L12 ,región marco n2)  
 <400> 235

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

25 <210> 236  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> VK1 (L12, región marco 3)  
 <400> 236

Gly Val Pro Ser Arg Phe ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

35 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

40 <210> 237  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> H9lgG4 (Cadena Pesada)  
 <400> 237

ES 2 495 092 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30  
Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60  
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80  
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

ES 2 495 092 T3

85					90					95					
Arg	Asp	Pro	Ala	Asp	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr
	210					215					220				
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr



ES 2 495 092 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

## REIVINDICACIONES

- 1.Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo comprende
- (a) una secuencia de región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19; y
- 5 (b) una secuencia de región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28.
- 2.Un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo comprende
- (a) una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237; y
- (b) una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.
- 10 3.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo humanizado se fija a vWF con una afinidad (Kd) de 10 nM o menos.
- 4.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo humanizado compite para fijación a vWF con una afinidad (Ki) de 100 nM o menos.
- 15 5.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo humanizado se fija al dominio A1 de vWF con una afinidad (Kd) de 10 nM o menos.
- 6.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo humanizado compite para fijación al dominio A1 de vWF con una afinidad (Ki) de 100 nM o menos.
- 7.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo humanizado tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que 65°C.
- 20 8.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo humanizado tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que el anticuerpo no humanizado paterno.
- 9.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo humanizado retiene la misma actividad que el anticuerpo no humanizado paterno o que un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables del anticuerpo no humanizado paterno y una región Fc humana.
- 25 10.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 9, en donde la actividad se mide como actividad de aglutinación de las plaquetas inducida por ristocetina.
- 11.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo humanizado carece de función efectora.
- 30 12.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo humanizado comprende una región Fc derivada de IgG4.
- 13.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo humanizado es específico para el dominio A1 de vWF humano.
- 35 14.El anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de longitud total.
- 15.El fragmento de fijación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el fragmento de fijación es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo constituido por Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub>, y un diacuerpo.
- 40 16.Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de la reivindicación 2, que comprende la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena ligera del vector GS264 como se ha depositado en un microorganismo con DSMZ que tiene el No. de acceso DSM 21059 y la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena pesada del vector GS265 como se ha depositado en un microorganismo con DSMZ que tiene el No. de acceso DSM 21060.
- 45 17.Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 19 y una secuencia de la región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 28.

- 18.Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 237 y una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 238.
- 19.Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.
- 5 20.Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 o el vector de la reivindicación 19.
- 21.Un método de producción de un anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 20 de tal modo que el ácido nucleico se expresa y se produce el anticuerpo.
- 10 22.Una composición que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 23.Una composición que comprende un primer anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un segundo anticuerpo que se fija al dominio A1 de vWF.
- 24.La composición de la reivindicación 23, en donde el segundo anticuerpo es AJW-200.
- 15 25.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como un medicamento que comprende administrar el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 26.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF que comprende administrar el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 20 27.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de la reivindicación 25, en donde el medicamento se utiliza para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF.
- 28.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de la reivindicación 26 ó 27, en donde el trastorno mediado por vWF es una enfermedad o trastorno trombótico.
- 25 29.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de la reivindicación 28, en donde el trastorno trombótico es una enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular tal como ataque isquémico.
- 30.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de la reivindicación 29, en donde la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con diabetes.
- 30 31.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de la reivindicación 28, en donde la enfermedad trombótica comprende inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad de células falciformes, rechazo de xenoinjerto, trastorno vascular periférico, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes.
- 32.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de la reivindicación 29, en donde la enfermedad cerebrovascular es demencia vascular, ataque isquémico, o predicción de ataques recurrentes.
- 35 33.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para inhibir la agregación plaquetaria, pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de hemorragia.
- 34.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz que oscila desde aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la DE100 sin causar signos clínicos de hemorragia.
- 40 35.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo se administra por vía subcutánea.
- 45 36.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo se administra por vía intravenosa.

37.El anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo se administra por vía intravenosa en combinación con tratamientos radiológicos.

5 38.Un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF.

39.Un kit que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de fijación del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF.

Figura 1

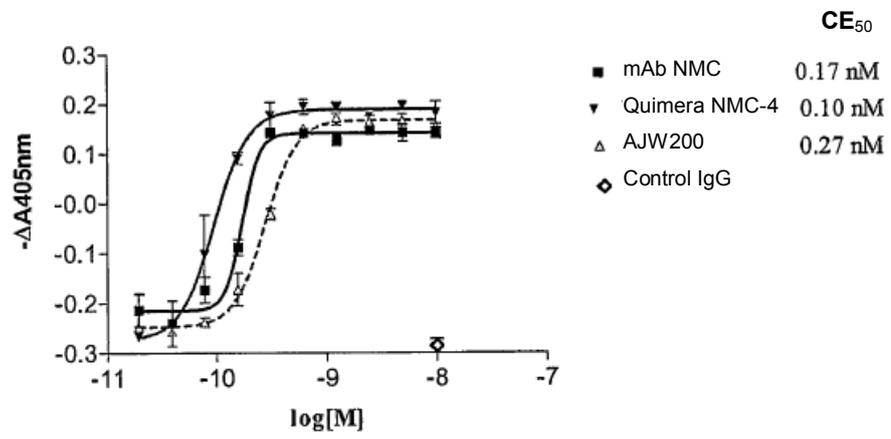
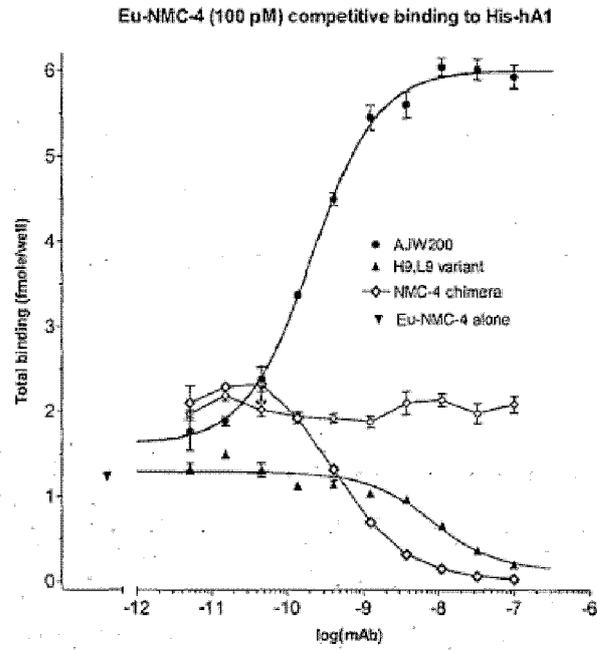


Figure 2

A.



B.

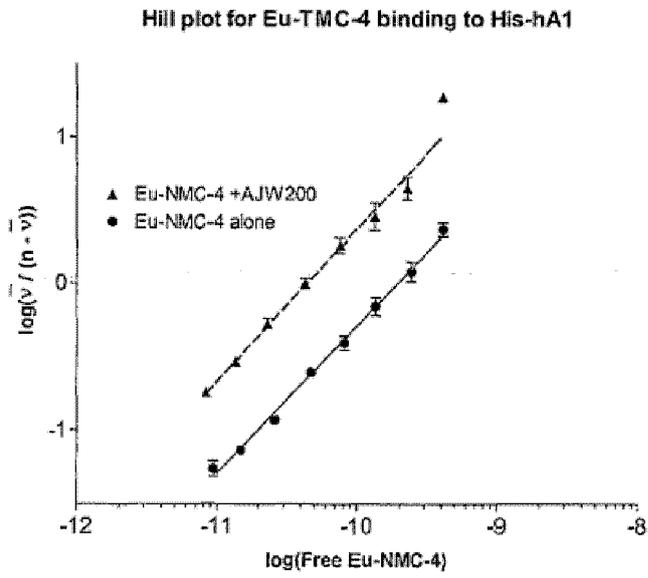


Figura 3

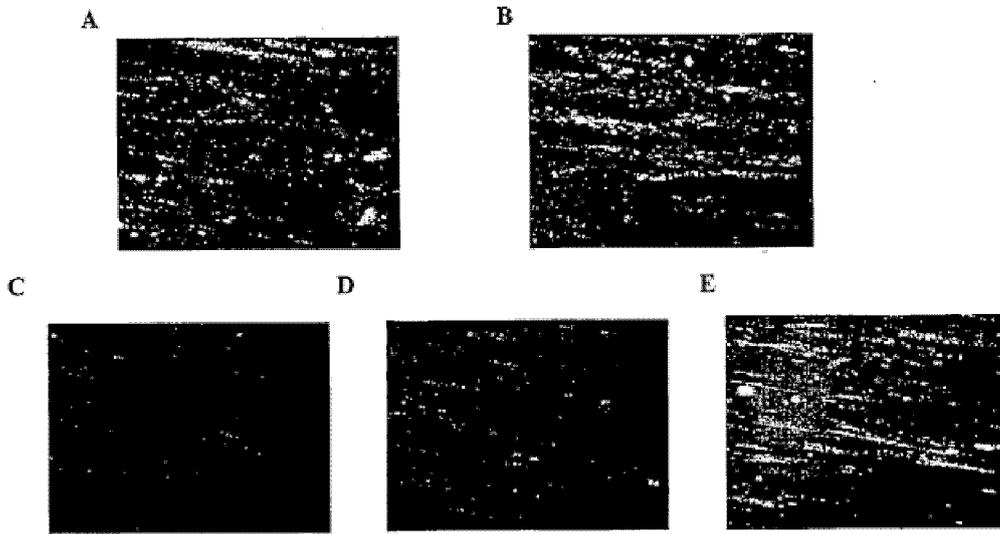


Figura 4

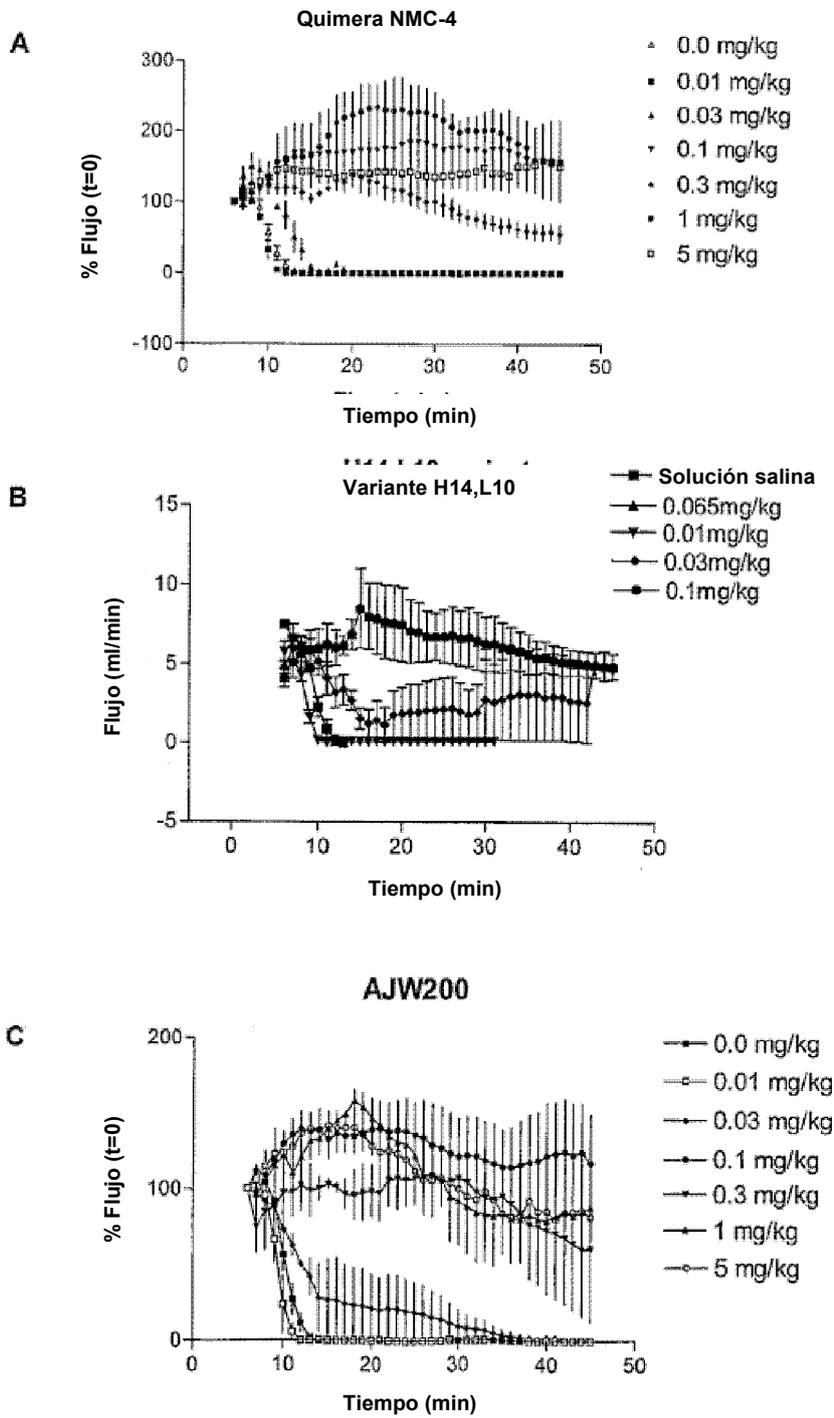


Figura 5

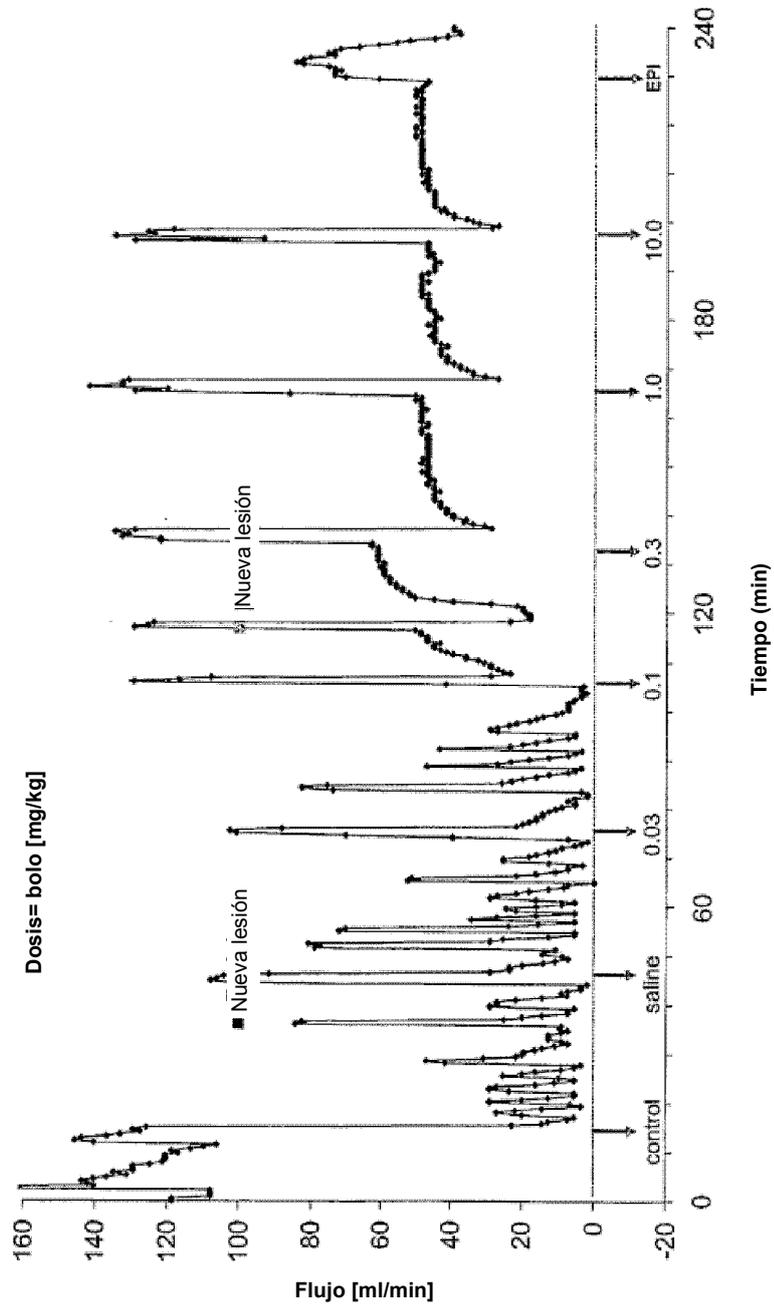


Figura 6

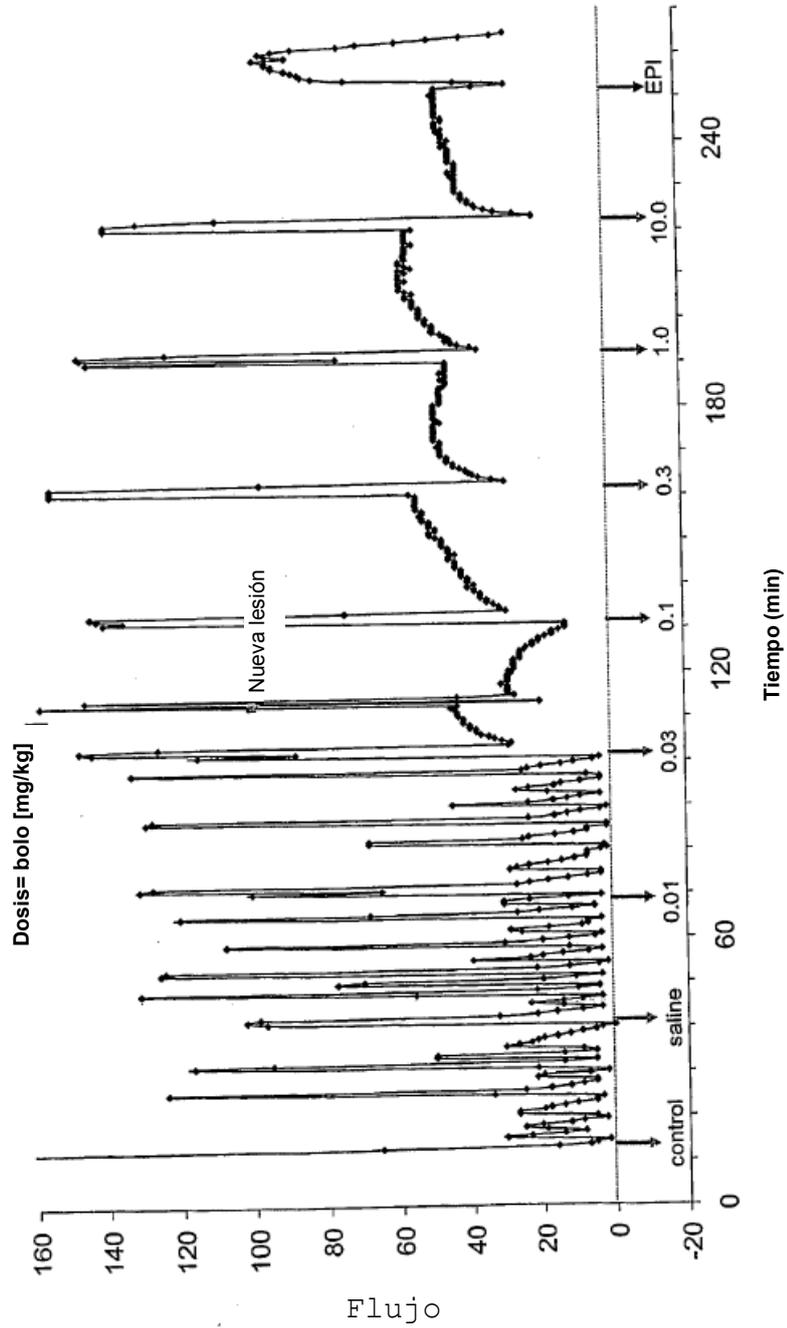


Figura 7

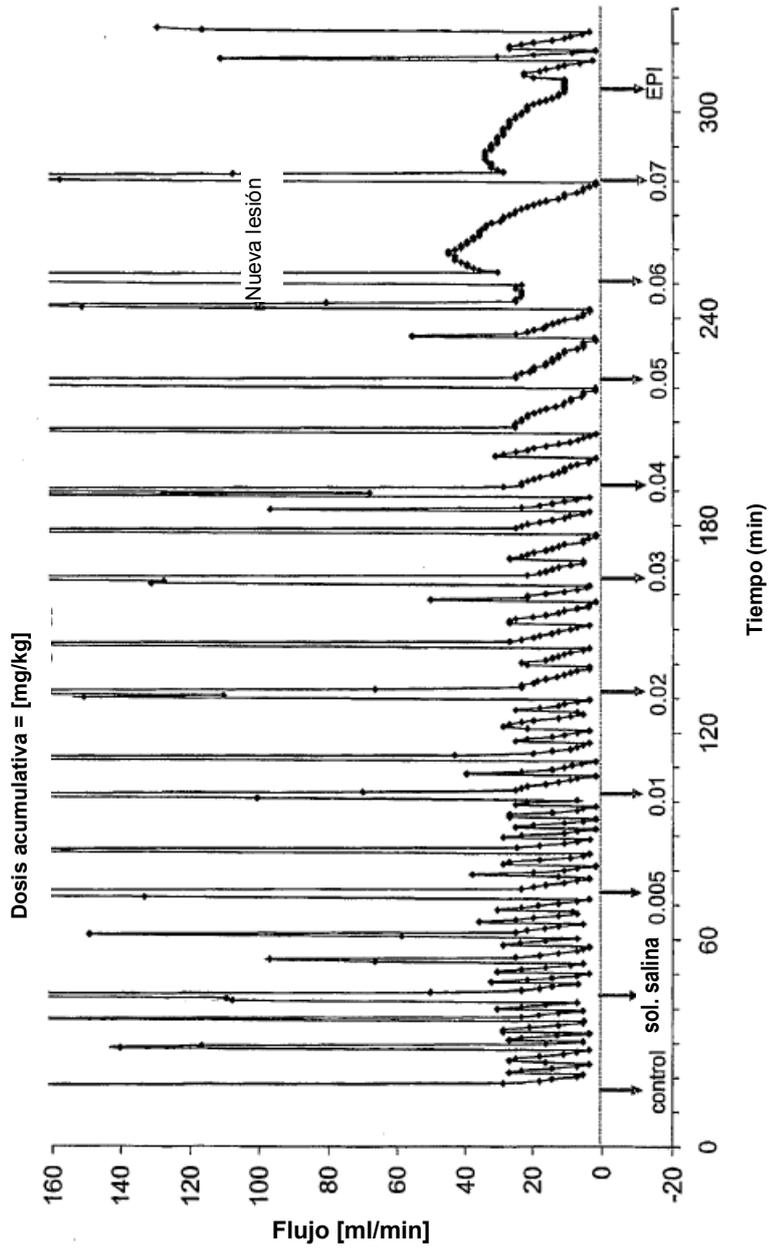


Figura 8

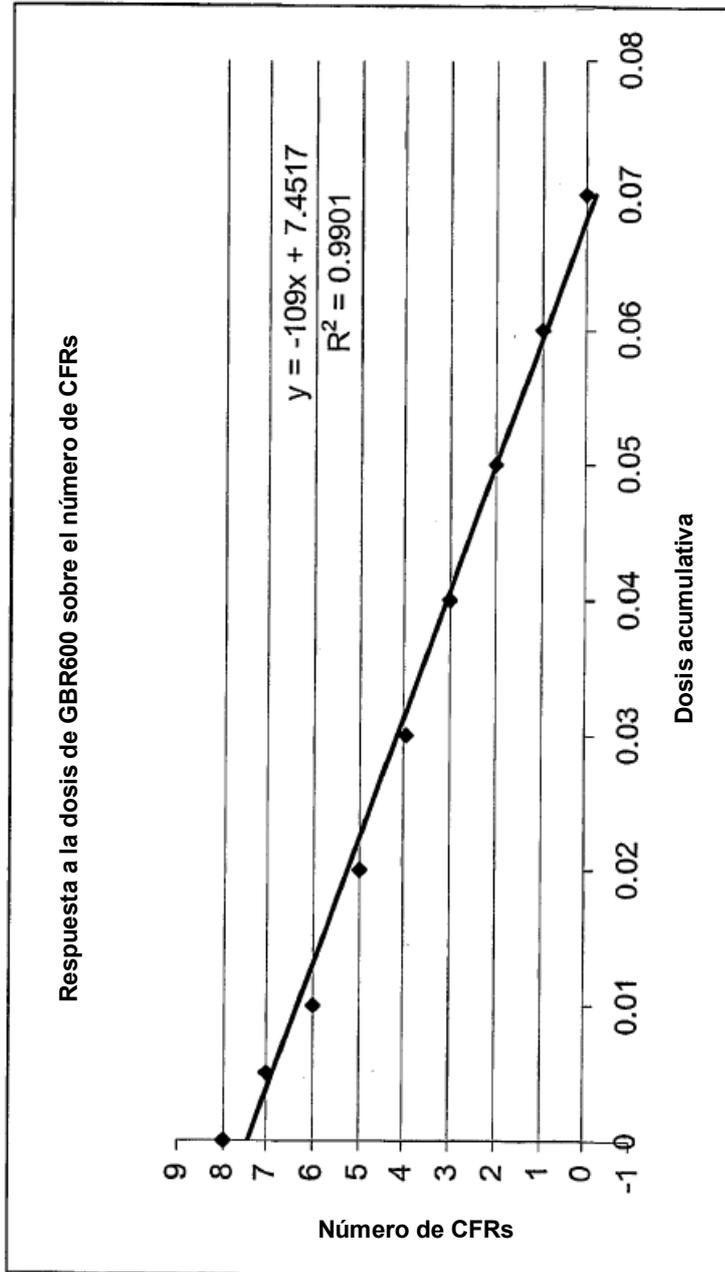


Figura 9

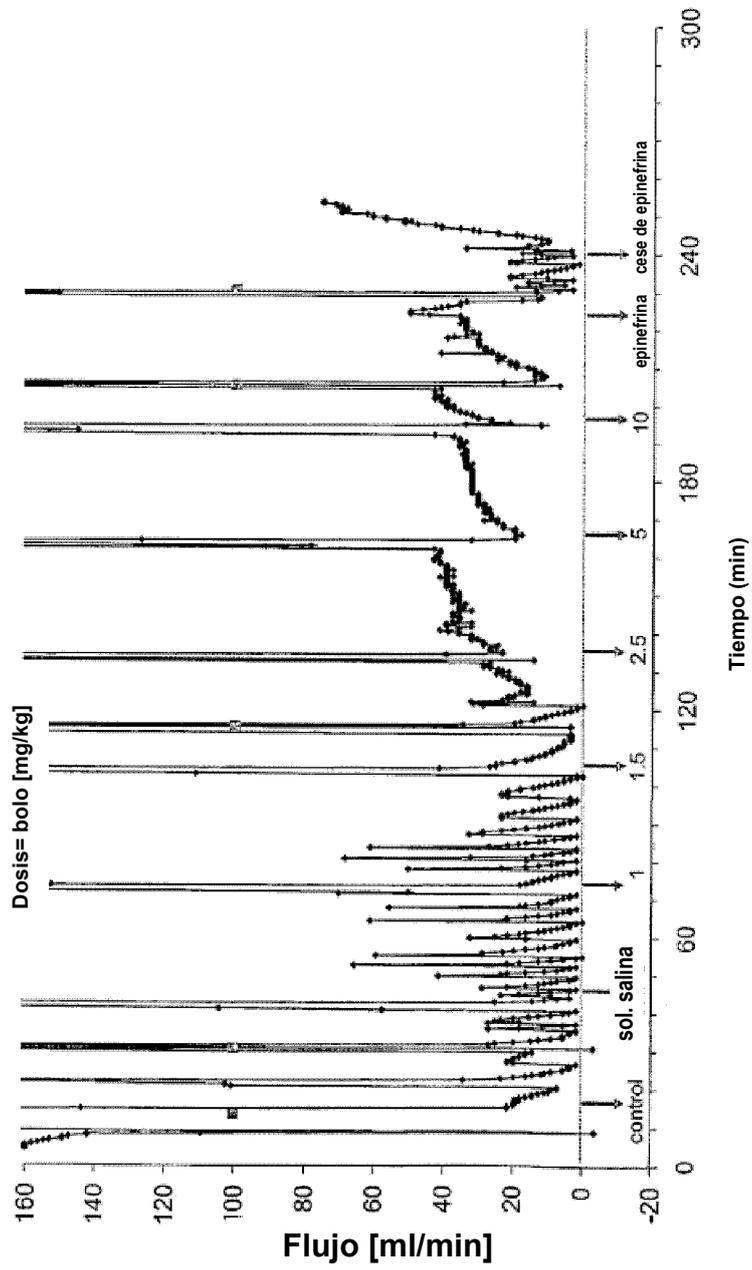


Figura 10

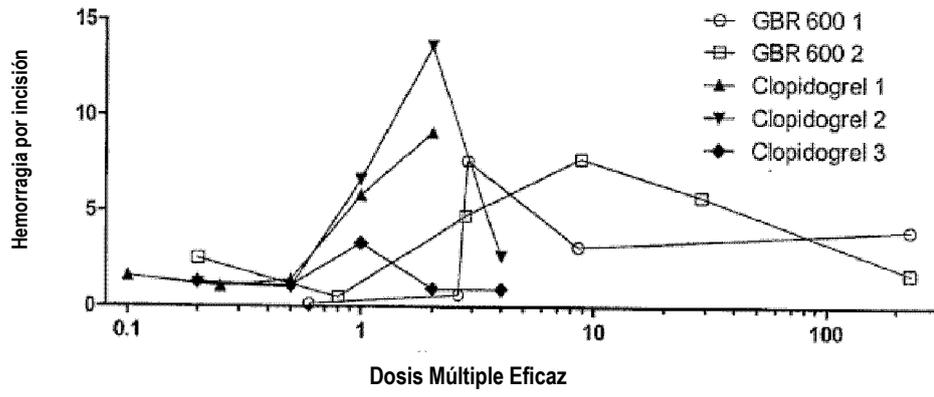
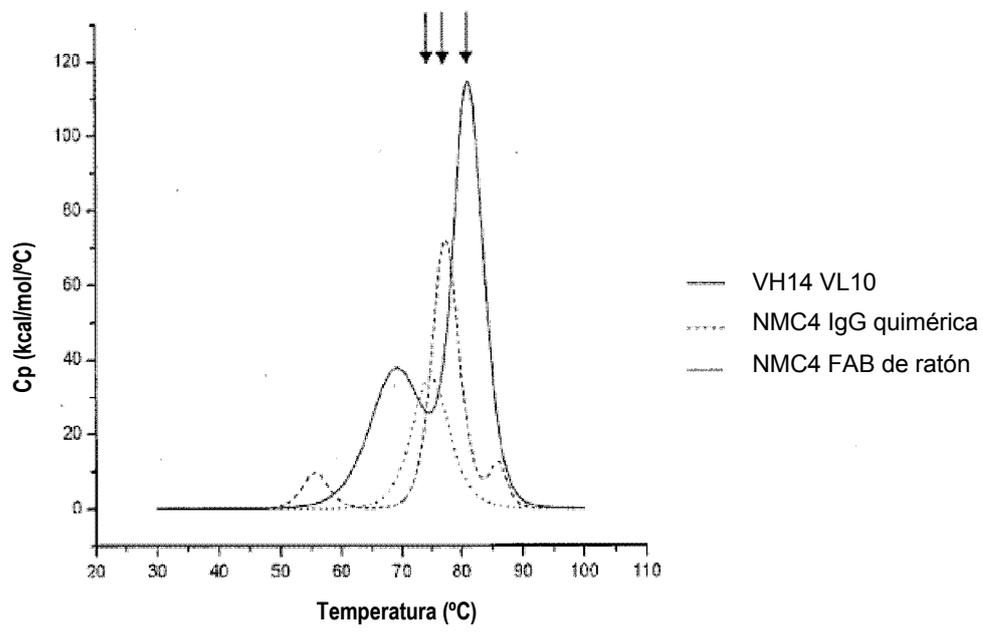


Figura 11



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