

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 992**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2011 PCT/EP2011/050749**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO2011089183**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2011 E 11703410 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2525812**

54 Título: **Antídotos de anticoagulantes**

30 Prioridad:

17.09.2010 US 383914 P
20.01.2010 EP 10151239

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)**
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

72 Inventor/es:

VAN RYN, JOANNE;
PARK, JOHN EDWARD;
HAUEL, NORBERT;
KUNZ, ULRICH;
LITZENBURGER, TOBIAS;
CANADA, KEITH;
SINGH, SANJAYA y
WATERMAN, ALISA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 992 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

Antídotos de anticoagulantes

Antecedentes de la invención**Campo técnico**

- 5 La presente invención está relacionada con el campo de la medicina, en particular con el campo de la terapia anticoagulante.

Información de antecedentes

10 Los anticoagulantes son sustancias que previenen la coagulación; es decir, impiden que coagule la sangre. Los anticoagulantes se usan ampliamente en terapia humana como medicación para trastornos trombóticos, por ejemplo para la prevención primaria y secundaria de trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infartos de miocardio e ictus en las personas predisuestas.

15 Una clase importante de anticoagulantes orales actúa antagonizando los efectos de la vitamina K, por ejemplo las cumarinas, que incluyen la warfarina. Una segunda clase de compuestos inhiben la coagulación indirectamente a través de un cofactor tal como la antitrombina III o el cofactor II de la heparina. Ésta incluye varios productos de heparina de bajo peso molecular que catalizan la inhibición predominantemente del factor Xa (y en un menor grado de la trombina) a través de la antitrombina III (bemiparina, certoparina, dalteparina, enoxaparina, nadroparina, pamaparina, reviparina, tinzaparina). Oligosacáridos de cadena más pequeña (fondaparinux, idraparinux) inhiben únicamente el factor Xa a través de la antitrombina III. Los heparinoides (danaparoid, sulodexida, dermatán sulfato) actúan a través de los dos cofactores e inhiben tanto al factor Xa como a la trombina. Una tercera clase representa los inhibidores directos de la coagulación. Los inhibidores directos del factor Xa incluyen apixabán, edoxabán, otamixabán, rivaroxabán, y los inhibidores directos de la trombina incluyen las hirudinas bivalentes (bivalirudina, lepirudina, desirudina), y los compuestos monovalentes argatrobán y dabigatrán.

20 Como la coagulación sanguínea es un mecanismo biológico para detener las hemorragias, un efecto secundario de la terapia anticoagulante puede ser episodios hemorrágicos indeseados. Por lo tanto, es deseable proporcionar un antídoto para poder detener dichos episodios hemorrágicos relacionados con anticoagulantes cuando se producen (Zikria y Ansell, Current Opinion in Hematology 2009, 16(5): 347-356). Una forma de conseguir esto es mediante la neutralización de la actividad del compuesto anticoagulante presente en el paciente después de la administración.

25 Son antídotos de anticoagulantes disponibles actualmente protamina (para la neutralización de la heparina) y vitamina K para la neutralización de antagonistas de vitamina K tales como warfarina. También se han usado plasma fresco congelado y factor VIIa recombinante como antídotos no específicos en pacientes con tratamiento con heparina de bajo peso molecular, que padecen traumatismos importantes o hemorragia severa (Lauritzen, B. et al, Blood, 2005, 607A-608A.). También se presentan fragmentos de protamina (Patente de Estados Unidos N° 6.624.141) y pequeños péptidos sintéticos (Patente de Estados Unidos N° 6.200.955) como antídotos de heparina o de heparina de bajo peso molecular; y muteínas de trombina (Patente de Estados Unidos N° 6.060.300) como antídotos para el inhibidor de trombina. Se han presentado intermedios y derivados de protrombina como antídotos de hirudina e inhibidores de trombina sintéticos (Patentes de Estados Unidos N° 5.817.309 y 6.086.871). Para inhibidores directos del factor Xa, se han propuesto análogos inactivos del factor Xa como antídotos (documento WO2009042962). Además, se ha usado factor VIIa recombinante para invertir el efecto de inhibidores indirectos del factor Xa dependientes de antitrombina III tales como fondaparinux e idraparinux (Bijsterveld, NR et al, Circulation, 2002, 106:2550-2554; Bijsterveld, NR et al, British J. of Haematology, 2004(124): 653-658). Se proporciona una revisión de métodos de inversión anticoagulante en Schulman y Bijsterveld, Transfusion Medicine Reviews 2007: 21(1), 37-48.

30 Zikria et al., Curr. Opin. Hematol. (Sep 2009), Vol 16, No. 5, páginas 347-356 dan a conocer las ventajas del inhibidor directo de trombina dabigatran y ponen en evidencia la ausencia de antídotos de inhibidores directos de trombina.

35 Existe la necesidad de proporcionar antídotos mejorados para terapias anticoagulantes y, en particular, para proporcionar antídotos para inhibidores directos de trombina tales como dabigatrán para el que no se han descrito hasta ahora antídotos específicos.

Breve compendio de la invención

- 40 En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene especificidad de unión por dabigatrán, como se describe en las reivindicaciones.

En aspectos de referencia, que no son parte de la presente invención, el anticoagulante es un heterociclo bicíclico disustituido de fórmula general



en la que

A representa un grupo carbonilo o sulfonilo unido al resto benzo, pirido o tieno del grupo Het,

B representa un grupo etileno en el que el grupo metileno unido al grupo Ar puede estar reemplazado por un átomo de oxígeno o azufre o por un grupo -NR₁-, en el que

5 R₁ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₄,

E representa un grupo R_bNH-C(=NH)- en el que

R_b representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxil, alcoxicarbonilo C₁₋₉, ciclohexiloxycarbonilo, fenil-alcoxicarbonilo C₁₋₃, benzoilo, p-alquil C₁₋₃-benzoilo o piridinilo, mientras que el resto etoxi de la posición 2 del grupo alcoxicarbonilo C₁₋₉ mencionado anteriormente puede estar sustituido adicionalmente con un grupo alquil C₁₋₃sulfonilo o 2-(alcoxi C₁₋₃)-etilo,

Ar representa un grupo 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con un átomo de cloro o con un grupo metilo, etilo o metoxi o representa un grupo 2,5-tienileno,

Het representa un grupo 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-bencimidazolileno, 1-ciclopropil-2,5-bencimidazolileno, 2,5-benzotiazolileno, 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-indolileno, 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-imidazo[4,5-b]piridinileno, 3-(alquil C₁₋₃)-2,7-imidazo[1,2-a]piridinileno o 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-tieno[2,3-d]imidazolileno y

R_a representa un grupo R₂NR₃- en el que

R₂ es un grupo alquilo C₁₋₄ que puede estar sustituido con un grupo carboxi, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, benciloicarbonilo, alquilsulfonil C₁₋₃aminocarbonilo o 1H-tetrazol-5-ilo,

un grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo hidroxil, benciloxil, carboxi-alquil C₁₋₃amino, alcoxicarbonil C₁₋₃-alquilamino C₁₋₃, N-(alquil C₁₋₃)-carboxi-alquilamino C₁₋₃ o N-(alquil C₁₋₃)-alcoxicarbonil C₁₋₃-alquilamino C₁₋₃, mientras que en los grupos mencionados anteriormente, el átomo de carbono de la posición α con respecto al átomo de nitrógeno adyacente puede estar sin sustituir,

R₃ representa un grupo cicloalquilo C₃₋₇, un grupo propargilo, en el que la parte insaturada puede no estar unida directamente al átomo de nitrógeno del grupo R₂NR₃, un grupo fenilo opcionalmente sustituido con un átomo de flúor o cloro, o con un grupo metilo o metoxi, un grupo pirazolilo, piridazolilo o piridinilo opcionalmente sustituido con un grupo metilo o

R₂ y R₃, junto con el átomo de nitrógeno que está entre ellos, representan un grupo cicloalquilenoinmino de 5 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con un grupo carboxi o alcoxicarbonilo C₁₋₄, con el que puede estar condensado además un anillo de fenilo,

30 los tautómeros, los estereoisómeros y las sales del mismo.

En un aspecto de referencia, el anticoagulante es un compuesto seleccionado entre

(a) N-Fenil-N-(2-carboxietil)-amida del ácido 2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-benzotiazol-5-carboxílico,

(b) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletal)-amida del ácido 2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-benzotiazol-5-il-carboxílico,

35 (c) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletal)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

(d) N-Fenil-N-(3-hidroxicarbonilpropil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

40 (e) N-(2-Piridil)-N-(hidroxicarbonilmetil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

(f) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletal)-amida del ácido 1-metil-2-[2-(2-amidinotiofen-5-il)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

(g) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletal)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

- (h) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[2-(4-amidinofenil)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (i) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[2-(4-amidinofenil)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (j) N-Fenil-N-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-amida del ácido 1-metil-2-[2-(4-amidinofenil)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 5 (k) N-Fenil-N-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (l) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 10 (m) N-(3-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (n) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (o) N-Fenil-N-[(N-hidroxicarboniletil-N-metil)-2-aminoetil]-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 15 (p) N-(3-Fluorofenil)-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (q) N-(4-Fluorofenil)-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (r) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-fenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 20 (s) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarbonil-etil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-fenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (t) N-Fenil-N-(2-metoxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)aminometil]-indol-5-il-carboxílico,
- (u) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)aminometil]-tieno[2,3-d]imidazol-5-il-carboxílico,
- 25 (v) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (w) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 30 (x) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-fenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (y) N-(2-Piridil)-N-(2-etoxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-[4-(N-n-hexiloxicarbonilamidino)fenil]-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico, y

los tautómeros, estereoisómeros y las sales de los mismos.

- 35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo contra dabigatrán, exetilato de dabigatrán, y/o un O-acilglucurónido de dabigatrán.

En un aspecto adicional, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de un anticuerpo, en particular un fragmento Fab, Fab', o F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario, en particular un fragmento variable monocatenario (scFv), o un diacuerpo.

40

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente para uso en medicina, es decir, como medicamento.

En un aspecto adicional, la presente memoria se refiere a una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente para uso en la terapia o profilaxis de efectos secundarios de una terapia anticoagulante.

- 45 En un aspecto adicional, el efecto secundario es un episodio hemorrágico.

En un aspecto adicional, la presente memoria se refiere a un procedimiento de tratamiento de efectos secundarios

de una terapia anticoagulante, que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente a un paciente que lo necesita.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende una molécula de anticuerpo como está descrita, junto con un envase y una etiqueta.

5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Aumento del tiempo de coagulación observado con concentraciones crecientes de dabigatrán usando el ensayo de tiempo de coagulación de la trombina. La concentración 200 nM tuvo como resultado una elevación de ~5 veces en el tiempo de coagulación con respecto al valor inicial y se usó en la primera y segunda serie de experimentos. En la última serie de experimentos se usó la concentración 500 nM (supraterapéutica).

10 Figura 2: Cuatro anticuerpos diferentes contra dabigatrán (A-D) neutralizaron el largo tiempo de coagulación del dabigatrán en plasma humano. La coagulación basal en plasma humano fue de 10,9 segundos, cuando se preincubó dabigatrán 200 nM con plasma, la coagulación se prolongó a 51 segundos. Cada anticuerpo se añadió a plasma preincubado con una concentración 200 nM de dabigatrán y se incubó adicionalmente durante 5 min. Después se inició el tiempo de coagulación de la trombina mediante la adición de trombina. Cada anticuerpo pudo
15 invertir el tiempo de coagulación del dabigatrán en diferentes grados. La solución más concentrada produjo la mayor inversión de actividad anticoagulante.

Figura 3: Se midió el efecto de concentraciones crecientes de anticuerpo policlonal (anticuerpo D) añadido a plasma humano que se había preincubado con dabigatrán 200 nM. El tiempo de coagulación basal fue de 11 segundos, la adición de dabigatrán prolongó la coagulación a 63,7 segundos. Después se ensayó el efecto de diluciones
20 crecientes de anticuerpo sobre la inversión de la prolongación del tiempo de coagulación de trombina con dabigatrán. La concentración mínima redujo el tiempo de coagulación de trombina a 43,9 segundos. Las concentraciones superiores redujeron completamente el tiempo de coagulación de trombina hasta los niveles basales y dieron como resultado una neutralización completa del efecto anticoagulante de dabigatrán. La adición de un anticuerpo policlonal de conejo no específico (cuadrado) no tuvo ningún efecto sobre la inversión del efecto
25 anticoagulante de dabigatrán.

Figura 4: Se midió el efecto de concentraciones crecientes de anticuerpo policlonal (anticuerpo D) añadido a plasma humano que se había preincubado con dabigatrán 500 nM. El tiempo de coagulación basal fue de 10,9 segundos, la adición de esta mayor concentración de dabigatrán prolongó la coagulación hasta 111,7 segundos (aumento ~10 veces). El efecto de una dilución 1:2 de anticuerpo o solución madre invirtió la prolongación del tiempo de
30 coagulación de trombina con dabigatrán de una manera dependiente de la concentración. La máxima concentración también invirtió completamente el tiempo de coagulación de trombina a niveles basales y tuvo como resultado una neutralización completa del efecto anticoagulante de incluso concentraciones supraterapéuticas de dabigatrán.

Figura 5: Secuencias de regiones variables de cadenas pesadas de molécula de anticuerpo anti-dabigatrán.

Figura 6: Secuencias de regiones variables de cadenas ligeras de molécula de anticuerpo anti-dabigatrán.

35 Figura 7: Un anticuerpo monoclonal de ratón A (Clon 22) invierte el efecto anticoagulante del dabigatrán en plasma humano y en sangre humana entera. Se añadieron concentraciones crecientes de anticuerpo de ratón a plasma humano o sangre entera que se habían preincubado con dabigatrán 30 nM. El ensayo se inició mediante la adición de 1,5 – 2 U/ml de trombina y se midió el tiempo de coagulación. Una actividad de dabigatrán del 100% se definió como la diferencia en tiempo de coagulación en presencia y ausencia de compuesto. El anticuerpo inhibió de una
40 manera dependiente de la dosis la prolongación del tiempo de coagulación mediada por dabigatrán.

Figura 8: Un Fab de ratón generado a partir del anticuerpo del Clon 22 revierte el efecto anticoagulante del dabigatrán en plasma humano. Se añadieron concentraciones crecientes de Fab de ratón a plasma humano que se había preincubado con dabigatrán 7 nM. El anticuerpo intacto también se ensayó como control positivo. El ensayo se inició mediante la adición de 0,4 U/ml de trombina y se midió el tiempo de coagulación. La inhibición de 100% se
45 definió como el bloqueo completo del aumento en el tiempo de coagulación mediado por dabigatrán. La dosis de Fab inhibió de una manera dependiente de la dosis la prolongación del tiempo de coagulación inducida por dabigatrán en plasma humano.

Figura 9: Un anticuerpo monoclonal de ratón A (Clon 22) invierte el efecto anticoagulante de acilglucurónido de dabigatrán en plasma humano. Se añadieron concentraciones crecientes de anticuerpo de ratón a plasma humano que se había preincubado con una concentración 7 nM de acilglucurónido de dabigatrán o dabigatrán. El ensayo se
50 inició mediante la adición de 0,4 U/ml de trombina y se midió el tiempo de coagulación. La inhibición de 100% se definió como el bloqueo completo del aumento en el tiempo de coagulación mediado por el compuesto. La dosis de anticuerpo inhibió de una manera dependiente de la dosis la prolongación del tiempo de coagulación inducida por acilglucurónido de dabigatrán en plasma humano.

55 Figura 10: Un Fab humanizado (Fab 18/15) invierte el efecto anticoagulante del dabigatrán en plasma humano. Se añadieron concentraciones crecientes de Fab 18/15 a plasma humano que se había preincubado con dabigatrán 7

nM. El ensayo se inició mediante la adición de 0,4 U/ml de trombina y se midió el tiempo de coagulación. La inhibición de 100% se definió como el bloqueo completo del aumento en el tiempo de coagulación mediado por dabigatrán. La dosis de Fab inhibió de una manera dependiente de la dosis la prolongación del tiempo de coagulación inducida por dabigatrán en plasma humano.

5 Figura 11: The ex vivo whole blood thrombin clotting time (3.0 U/mL thrombin) in rats receiving dabigatran as a continuous infusion with a bolus administration of equimolar Fab at t=0. The line with solid circles represents vehicle treatment without drug. The line with solid squares represents dabigatran anticoagulant activity without Fab. The line with solid triangles represents anticoagulant activity after administration of Fab. Data are expressed as the mean \pm SE, n=4 animals per treatment group.

10 Figura 12: El aPTT de sangre entera ex vivo en ratas que recibían dabigatrán como una infusión continua con una administración en bolo de Fab equimolar a t = 0. Los círculos rellenos representan el tratamiento con vehículo sin fármaco. La línea con cuadrados rellenos representa la actividad anticoagulante de dabigatrán sin Fab. La línea con triángulos rellenos representa la actividad anticoagulante después de la administración de Fab. Los datos se expresan como la media \pm ET, n = 4 animales por grupo de tratamiento.

15 Figura 13: El tiempo de coagulación de trombina de sangre entera ex vivo (3,0 U/ml de trombina) en ratas que recibieron dabigatrán como infusión continua con una administración en bolo de dosis crecientes de Fab a t = 0. La línea con círculos rellenos representa el tratamiento con vehículo sin fármaco. La línea con cuadrados rellenos representa la actividad anticoagulante de dabigatrán sin Fab. La línea con triángulos rellenos representa la actividad anticoagulante después de la administración equimolar de Fab y la línea discontinua 50% de la dosis equimolar. Los datos se expresan como la media \pm ET, n = 4 animales por grupo de tratamiento.

20 Figura 14: El aPTT de sangre entera ex vivo en ratas que recibieron dabigatrán como una infusión continua con una administración en bolo de dosis crecientes de Fab a t = 0. Los círculos rellenos representan el tratamiento con vehículo sin fármaco. La línea con cuadrados rellenos representa la actividad anticoagulante de dabigatrán sin Fab. La línea con triángulos rellenos representa la actividad anticoagulante después de la administración de equimolar Fab y la línea discontinua 50% de la dosis equimolar. Los datos se expresan como la media \pm ET, n = 4 animales por grupo de tratamiento.

Descripción Detallada de la Invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo capaz de neutralizar la actividad de dabigatrán.

30 Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, abreviado Ig) son proteínas gammaglobulinas que pueden encontrarse en la sangre o en otros fluidos corporales de vertebrados, y se usan por el sistema inmune para identificar y neutralizar objetos extraños, tales como bacterias y virus. Típicamente están hechos de unidades estructurales básicas - cada una con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras pequeñas - para formar, por ejemplo, monómeros con una unidad, dímeros con dos unidades o pentámeros con cinco unidades. Los anticuerpos pueden unirse, mediante interacción no covalente, a otras moléculas o estructuras conocidas como antígenos. Esta unión es específica en el sentido de que un anticuerpo sólo se unirá a una estructura específica con alta afinidad. La única parte del antígeno reconocida por un anticuerpo se denomina epítipo, o determinante antigénico. La parte del anticuerpo que se une al epítipo algunas veces se denomina parátipo y reside en el denominado dominio variable, o región variable (Fv) del anticuerpo. El dominio variable comprende tres denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) separadas por regiones flanqueantes (FR).

Dentro del contexto de esta invención, la referencia a CDR se basa en la definición de Chotia (Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901-917), junto con Kabat (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller and H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda (1983)).

45 La técnica ha desarrollado adicionalmente anticuerpos y les ha hecho herramientas versátiles en medicina y tecnología. De esta manera, en el contexto de la presente invención, las expresiones "molécula de anticuerpo" o "anticuerpo" (usados como sinónimos en la presente memoria) no incluyen sólo anticuerpos como pueden encontrarse en la naturaleza, que comprenden, por ejemplo, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, o sólo dos cadenas ligeras como en especies de camélidos, sino que además comprenden todas las moléculas que comprenden al menos un parátipo con especificidad de unión a un antígeno y similitud estructural con un dominio variable de una inmunoglobulina.

De esta manera, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de un anticuerpo, en particular un fragmento Fv, Fab, Fab' o F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario, en particular un fragmento variable monocatenario (scFv), un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), un diacuerpo.

55 Los anticuerpos policlonales representan una colección de moléculas de anticuerpo con diferentes secuencias de aminoácidos y pueden obtenerse a partir de la sangre de vertebrados después de la inmunización con el antígeno por procesos bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales (mAb o moAb) son anticuerpos monoespecíficos que son idénticos en secuencia de aminoácidos. Pueden producirse por tecnología de hibridoma a partir de una línea celular híbrida (denominada hibridoma) que representa un clon de una fusión de una célula B productora de anticuerpos específica con una célula de mieloma (cáncer de células B) (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7.). Como alternativa, pueden producirse anticuerpos monoclonales por expresión recombinante en células huésped (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (May 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." *J Immunol Methods* 204 (1): 77-87; véase también más adelante).

Para la aplicación en el ser humano, con frecuencia es deseable reducir la inmunogenicidad de anticuerpos procedentes originalmente de otra especie, tal como el ratón. Esto puede hacerse mediante la construcción de anticuerpos quiméricos, o por un proceso denominado "humanización". En este contexto, se entiende que un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que comprende una parte de secuencia (por ejemplo, un dominio variable) procedente de una especie (por ejemplo, ratón) fusionada a una parte de secuencia (por ejemplo, los dominios constantes) procedente de una especie diferente (por ejemplo, ser humano). Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende un dominio variable procedente originalmente de una especie no humana, en el que ciertos aminoácidos se han mutado para que la secuencia general de ese dominio variable se parezca más a una secuencia de un dominio variable humano. En la técnica son bien conocidos métodos de quimerización y humanización de anticuerpos (Billetta R, Lobuglio AF. "Chimeric antibodies". *Int Rev Immunol.* 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". *Nature*: 332:323.).

Además, se han desarrollado tecnologías para crear anticuerpos basándose en secuencias derivadas del genoma humano, por ejemplo por presentación en fagos o usando animales transgénicos (documento WO 90/05144; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." *J.Mol.Biol.*, 222, 581-597; Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296: 57-86, 2000; S. Carmen y L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display". *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2002 1(2):189-203; Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". *Int Rev Immunol.* 1995;13(1):65-93.; Brüggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice". *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Aug;8(4):455-8.). Estos anticuerpos son "anticuerpos humanos" en el contexto de la presente invención.

Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la presente invención también incluyen fragmentos de inmunoglobulinas que conservan propiedades de unión a antígenos, tales como fragmentos Fab, Fab' o F(ab')₂. Estos fragmentos pueden obtenerse por fragmentación de inmunoglobulinas, por ejemplo, por digestión proteolítica, o por expresión recombinante de dichos fragmentos. Por ejemplo, la digestión de inmunoglobulinas puede realizarse por medio de técnicas rutinarias, por ejemplo, usando papaína o pepsina (documento WO 94/29348), o endoproteinasa Lys-C (Kleemann, et al. *Anal. Chem.* 80, 2001-2009, 2008). La digestión con papaína o Lys-C de anticuerpos produce típicamente dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un F(ab')₂. Más adelante se presentan con más detalle métodos para producir moléculas de Fab por expresión recombinante en células hospedadoras.

Se han desarrollado varias tecnologías para poner dominios variables de inmunoglobulinas, o moléculas derivadas de estos dominios variables, en un contexto molecular diferente. Éstas también deben considerarse "moléculas de anticuerpo" de acuerdo con la presente invención. En general, estas moléculas de anticuerpo son de menor tamaño que las inmunoglobulinas, y pueden comprender una sola cadena de aminoácidos o estar compuestas de varias cadenas de aminoácidos. Por ejemplo, un fragmento variable monocatenario (scFv) es una fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas, unidas entre sí con un enlazador corto, normalmente serina (S) o glicina (G) (documentos WO 88/01649; WO 91/17271; Huston et al; *International Reviews of Immunology*, Volume 10, 1993, 195 - 217). Los "anticuerpos de un solo dominio" o "nanocuerpos" llevan un sitio de unión a antígeno en un solo dominio de tipo Ig (documentos WO 94/04678; WO 03/050531, Ward et al., *Nature*. 1989 Oct 12;341(6242):544-6; Revets et al., *Expert Opin Biol Ther.* 5(1):111-24, 2005). Uno o más anticuerpos de un solo dominio con especificidad de unión por el mismo antígeno o por un antígeno diferente pueden unirse entre sí. Los diacuerpos son moléculas de anticuerpo bivalentes que consisten en dos cadenas de aminoácidos que comprenden dos dominios variables (documento WO 94/13804, Holliger et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6444-8). Otros ejemplos de moléculas semejantes a anticuerpos son los anticuerpos de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF; Srinivasan y Roeske, *Current Protein Pept. Sci.* 2005, 6(2): 185-96). Un concepto diferente conduce a los denominados productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) que comprenden un dominio Fv unido a una bisagra monocatenaria y dominios efectores que carecen del dominio constante CH1 (documento WO 02/056910).

En otro aspecto, una molécula de anticuerpo puede tener incluso únicamente una relación estructural remota con un dominio variable de inmunoglobulina, o no tener ninguna relación en absoluto, siempre que tenga cierta especificidad de unión y afinidad comparables a un dominio variable de inmunoglobulina. Dicho "mimético de anticuerpo" que no es una inmunoglobulina, que algunas veces se denomina "proteína de andamiaje", puede basarse en los genes de proteína A, las lipocalinas, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición consenso de ankirina y tiorredoxina (Skerra, *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18(4): 295-304). Un aspecto de referencia

son moléculas de anticuerpo denominadas proteínas de repetición de ankirina (DARPin; Steiner et al., J Mol Biol. 2008 Oct 24;382(5): 1211-27; Stumpp MT, Amstutz P. Curr Opin Drug Discov Devel. 2007 Mar;10(2):153-9).

La molécula de anticuerpo puede estar fusionada (como una proteína de fusión) o unida de otra manera (mediante enlaces covalentes o no covalentes) a otras entidades moleculares que tienen un impacto indeseado sobre las propiedades de la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de anticuerpo, por ejemplo, la estabilidad en fluidos corporales tales como la sangre, en particular en el caso de anticuerpos monocatenarios o anticuerpos de dominio. A este respecto se han desarrollado varias tecnologías, en particular para prolongar la semivida de dichas moléculas de anticuerpo en la circulación, tales como la pegilación (documentos WO 98/25971; WO 98/48837; WO 2004081026), la fusión o la unión covalente de otra manera de la molécula de anticuerpo a otra molécula de anticuerpo que tenga afinidad por una proteína del suero tal como albúmina (documentos WO 2004041865; WO 2004003019), o la expresión de la molécula de anticuerpo como una proteína de fusión con todo o parte de una proteína del suero tal como albúmina o transferrina (documento WO 01/79258).

La molécula de anticuerpo tiene especificidad de unión por el anticoagulante dabigatrán. "Especificidad de unión" significa que la molécula de anticuerpo tiene una afinidad de unión significativamente mayor por el anticoagulante que por moléculas no relacionadas estructuralmente.

Afinidad es la interacción entre un solo sitio de unión a antígeno en una molécula de anticuerpo y un solo epítopo. Se expresa por la constante de asociación $K_A = k_{as}/k_{dis}$, o la constante de disociación $K_D = k_{dis}/k_{as}$.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo se une al anticoagulante con una afinidad, determinada por análisis de resonancia de plasmón de superficie (Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", Curr Opin Immunol. 1993 Apr;5(2):282-6.), con un valor de K_D que varía de 0,1 pM a 100 μ M, preferiblemente de 1 pM a 100 μ M, preferiblemente de 1 pM a 1 μ M. La afinidad de un anticuerpo también puede medirse usando la tecnología del ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Darling, R.J., and Braut P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." ASSAY and Drug Development Technologies. 2004, Dec 2(6): 647-657).

La afinidad de unión de una molécula de anticuerpo puede aumentarse por un proceso conocido como maduración de afinidad (Marks et al., 1992, Biotechnology 10:779-783; Barbas, et al., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813; Shier et al., 1995, Gene 169:147-155). Por lo tanto, también se incluyen en la presente invención anticuerpos madurados por afinidad.

En un aspecto adicional de la invención, la molécula de anticuerpo es capaz de neutralizar la actividad del anticoagulante dabigatrán. Es decir, tras la unión a la molécula de anticuerpo, el anticoagulante ya no puede ejercer su actividad anticoagulante, o ejerce esta actividad a una magnitud reducida significativamente. Preferiblemente, la actividad anticoagulante se reduce al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces o 100 veces tras la unión al anticuerpo, como se determina en un ensayo de actividad que es apropiado para el anticoagulante en cuestión, particularmente un ensayo de coagulación que es sensible a trombina, tal como el tiempo de coagulación de ecarina o el tiempo de coagulación de trombina (H. Bounameaux, Marbet GA, Lammler B, et al. "Monitoring of heparin treatment. Comparison of thrombin time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration, and analysis of the behaviour of antithrombin III". American Journal of Clinical Pathology 1980 74(1): 68-72).

Para fabricar las moléculas de anticuerpo de la invención, el experto en la materia puede elegir entre una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica (Norderhaug et al., J Immunol Methods 1997, 204 (1): 77-87; Kipriianow y Le Gall, Molecular Biotechnology 26: 39- 60, 2004; Shukla et al., 2007, J. Chromatography B, 848(1): 28-39).

Los anticoagulantes son bien conocidos en la técnica, como se ha indicado anteriormente. El anticoagulante de la invención es un inhibidor directo de trombina. Anticoagulantes de referencia son un inhibidor del Factor Xa o un antagonista de vitamina K. Ejemplos de antagonista de vitamina K son las cumarinas, que incluyen la warfarina. Son ejemplos de inhibidores indirectos predominantemente del factor Xa el grupo de sustancias de heparina que actúan mediante la activación de la antitrombina III, incluyendo varios productos de heparina de bajo peso molecular (bemiparina, certoparina, dalteparina, enoxaparina, nadroparina, parnaparina, reviparina, tinzaparina), ciertos oligosacáridos (fondaparinux, idraparinux), heparinoides (danaparoid, sulodexida, dermatán sulfato), y los inhibidores directos del factor Xa (apixabán, otamixabán, rivaroxabán). Los ejemplos de inhibidores de trombina incluyen las hirudinas bivalentes (bivalirudina, lepirudina, desirudina), y los compuestos monovalentes argatrobán y dabigatrán.

El anticoagulante para el que tiene especificidad el anticuerpo de la invención, es dabigatrán.

En un aspecto de referencia, que no es parte de la invención, el anticoagulante es un heterociclo bicíclico disustituido de fórmula general



en la que

A representa un grupo carbonilo o sulfonilo unido al resto benzo, pirido o tieno del grupo Het,

B representa un grupo etileno en el que el grupo metileno unido al grupo Ar puede estar reemplazado por un átomo de oxígeno o azufre o por un grupo -NR₁-, en el que

R₁ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₄,

5 E representa un grupo R_bNH-C(=NH)- en el que

R_b representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, alcóxicarbonilo C₁₋₉, ciclohexiloxycarbonilo, fenilalcóxicarbonilo C₁₋₃, benzoílo, p-alquil C₁₋₃-benzoílo o piridinólo, mientras que el resto etoxi de la posición 2 del grupo alcóxicarbonilo C₁₋₉ mencionado anteriormente puede estar sustituido adicionalmente con un grupo alquil C₁₋₃sulfonilo o 2-(alcoxi C₁₋₃)-etilo,

10 Ar representa un grupo 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con un átomo de cloro o con un grupo metilo, etilo o metoxi o representa un grupo 2,5-tienileno,

Het representa un grupo 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-bencimidazolileno, 1-ciclopropil-2,5-bencimidazolileno, 2,5-benzotiazolileno, 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-indolileno, 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-imidazo[4,5-b]piridinileno, 3-(alquil C₁₋₃)-2,7-imidazo[1,2-a]piridinileno o 1-(alquil C₁₋₃)-2,5-tieno[2,3-d]imidazolileno y

15 R_a representa un grupo R₂NR₃- en el que

R₂ es un grupo alquilo C₁₋₄ que puede estar sustituido con un grupo carboxi, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, benciloxycarbonilo, alquilsulfonil C₁₋₃aminocarbonilo o 1H-tetrazol-5-ilo,

20 un grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo hidroxilo, benciloxi, carboxi-alquil C₁₋₃amino, alcóxicarbonil C₁₋₃-alquilamino C₁₋₃, N-(alquil C₁₋₃)-carboxi-alquilamino C₁₋₃ o N-(alquil C₁₋₃)-alcóxicarbonil C₁₋₃-alquilamino C₁₋₃, mientras que en los grupos mencionados anteriormente, el átomo de carbono de la posición α con respecto al átomo de nitrógeno adyacente puede estar sin sustituir,

25 R₃ representa un grupo cicloalquilo C₃₋₇, un grupo propargilo, en el que la parte insaturada puede no estar unida directamente al átomo de nitrógeno del grupo R₂NR₃, un grupo fenilo opcionalmente sustituido con un átomo de flúor o cloro, o con un grupo metilo o metoxi, un grupo pirazolilo, piridazolilo o piridinilo opcionalmente sustituido con un grupo metilo o

R₂ y R₃ junto con el átomo de nitrógeno que está entre ellos representan un grupo cicloalquilenoinmino de 5 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con un grupo carboxi o alcóxicarbonilo C₁₋₄, con el que puede estar condensado además un anillo de fenilo,

30 los tautómeros, los estereoisómeros y las sales del mismo. Los compuestos de fórmula (I), la preparación de estos compuestos y su uso como anticoagulantes se han descrito en el documento WO 98/37075.

En un aspecto de referencia adicional, el anticoagulante es un compuesto seleccionado entre

(a) N-Fenil-N-(2-carboxietil)-amida del ácido 2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-benzotiazol-5-carboxílico,

(b) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-benzotiazol-5-il-carboxílico,

35 (c) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

(d) N-Fenil-N-(3-hidroxicarbonilpropil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

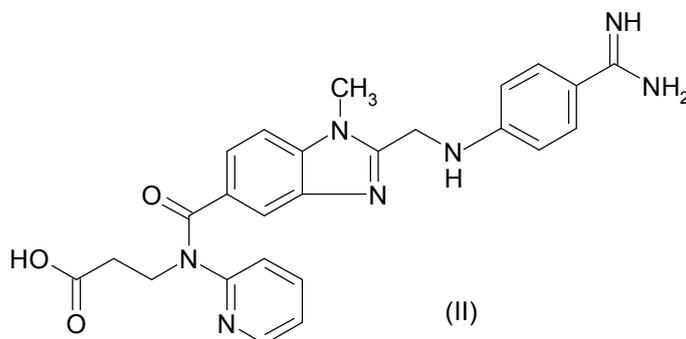
40 (e) N-(2-Piridil)-N-(hidroxicarbonilmetil)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

(f) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[2-(2-amidinotiofen-5-il)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

(g) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,

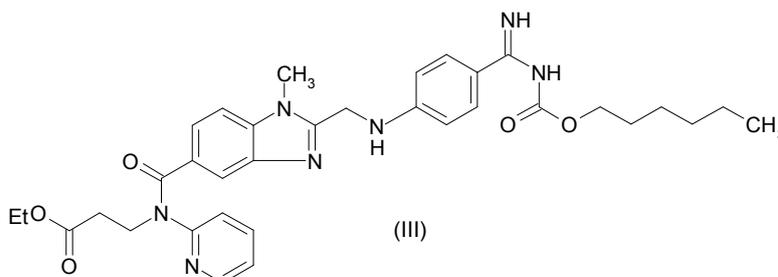
- (h) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[2-(4-amidinofenil)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (i) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[2-(4-amidinofenil)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (j) N-Fenil-N-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-amida del ácido 1-metil-2-[2-(4-amidinofenil)etil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 5 (k) N-Fenil-N-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (l) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-benzimidazol-5-il-carboxílico,
- 10 (m) N-(3-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-benzimidazol-5-il-carboxílico,
- (n) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-N-metil-aminometil]-benzimidazol-5-il-carboxílico,
- (o) N-Fenil-N-[(N-hidroxicarboniletíl-N-metil)-2-aminoetil]-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 15 (p) N-(3-Fluorofenil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (q) N-(4-Fluorofenil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (r) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-fenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 20 (s) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-fenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (t) N-Fenil-N-(2-metoxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)aminometil]-indol-5-il-carboxílico,
- (u) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)aminometil]-tieno[2,3-d]imidazol-5-il-carboxílico,
- 25 (v) N-Fenil-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (w) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidinofenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- 30 (x) N-(2-Piridil)-N-(2-hidroxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-fenil)-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico,
- (y) N-(2-Piridil)-N-(2-etoxicarboniletíl)-amida del ácido 1-metil-2-[N-[4-(N-n-hexiloxicarbonilamidino)fenil]-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico, y
- 35 los tautómeros, estereoisómeros y las sales de los mismos, habiéndose descrito todos ellos en el documento WO 98/37075.

El anticoagulante en el contexto de la presente invención es dabigatrán (CAS 211914-51-1, *N*-[2-(4-Amidinofenilaminometil)-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-ilcarbonil]-*N*-(2-piridil)-beta-alanina) que tiene la fórmula química (II):



- 5 El dabigatrán se conoce del documento WO 98/37075, que describe compuestos con un efecto inhibitor de trombina y el efecto de prolongar el tiempo de la trombina, con el nombre *N*-(2-piridil)-*N*-(2-etoxicarboniletil)-amida del ácido 1-metil-2-[*N*-(4-amidino)fenil]-aminometil]-bencimidazol-5-il-carboxílico. Véase también Huel et al. J Med Chem 2002, 45 (9): 1757-66.

Dabigatrán se aplica como un profármaco de fórmula (III):



- 10 El compuesto de fórmula III (denominado dabigatrán etexilato, CAS 211915-06-9; 3-[(2-[[4-(hexiloxycarbonilamino)imino-metil]-fenilamino]-metil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carbonil)-piridin-2-il-amino]-propionato de etilo) se convierte en el compuesto activo (II) después de entrar en el cuerpo. Un polimorfo preferido de dabigatrán etexilato es dabigatrán etexilato mesilato.

- 15 Las indicaciones principales del dabigatrán son la prevención postoperatoria de la trombosis venosa profunda, el tratamiento de una trombosis venosa profunda establecida y la prevención de ictus en pacientes con fibrilación auricular (Eriksson et al., Lancet 2007, 370 (9591): 949-56; Schulman S et al, N Engl J Med 2009, 361 (24): 2342-52; Connolly S et al., N Engl J Med 2009, 361 (12): 1139-51); Wallentin et al., Lancet 2010, 376 (9745): 975-983).

- 20 En el cuerpo humano, la ruta metabólica humana principal del dabigatrán es la glucuronidación del resto carboxilato (Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75). Tiene como resultado la formación del 1-O-acilglucurónido (anómero beta). El 1-O-acilglucurónido, además de una hidrólisis minoritaria para dar el aglicón, puede experimentar una migración de acilo no enzimática en solución acuosa, dando como resultado la formación de los 2-O-, 3-O-, y 4-O-acilglucurónidos. Los experimentos con el 1-O-acilglucurónido purificado y sus productos de reordenación isoméricos revelaron una prolongación equipotente del tiempo de tromboplastina parcial activada en comparación con dabigatrán.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo se une tanto a dabigatrán como a dabigatrán etexilato.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo se une tanto a dabigatrán como a O-acilglucurónidos de dabigatrán, en particular el 1-O-acilglucurónido de dabigatrán.

- 30 En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo se une además a los 2-O-, 3-O- y 4-O-acilglucurónidos de dabigatrán.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es capaz de neutralizar la actividad de dabigatrán y O-acilglucurónidos de dabigatrán, en particular el 1-O-acilglucurónido de dabigatrán.

- 35 En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo tiene especificidad de unión por dabigatrán y comprende las secuencias de CDR que se representan en las Figuras 5 y 6, y que además se especifican en las reivindicaciones.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena pesada que se representan en la Figura 5, y las secuencias de CDR de cadena ligera que se representan en la Figura 6, que se recitan en las reivindicaciones.

5 En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada como se representa en la Figura 5, y un dominio variable de cadena ligera como se representa en la Figura 6, como se especifica en las reivindicaciones.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada como se representa con la denominación Eng VH# 15 en la Figura 5, y una secuencia de dominio variable de cadena ligera como se representa con la denominación Eng VK# 18 en la Figura 6.

10 En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo tiene especificidad de unión por dabigatrán y comprende un dominio variable de cadena pesada con una secuencia de CDR1 de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de SEQ ID NO: 7, y una CDR3 de SEQ ID NO: 10, y un dominio variable de cadena ligera con una CDR1 de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de SEQ ID NO: 14, y una CDR3 de SEQ ID NO: 15.

15 En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de scFv. En este formato, los dominios variables descritos en la presente memoria pueden fusionarse entre sí con un péptido enlazador adecuado, por ejemplo seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 28, 29, 30 o 31. La construcción puede comprender estos elementos en el orden, desde el extremo N al extremo C, (dominio variable de cadena pesada)-(péptido enlazador)-(dominio variable de cadena ligera), o (dominio variable de cadena ligera)-(péptido enlazador)-(dominio variable de cadena pesada).

20 En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de scFv que comprende SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33. En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de scFv que consiste en SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33

25 En la técnica se conocen procesos que permiten la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican construcciones de sFv en células hospedadoras (tales como *E. coli*, *Pichia pastoris* o líneas de células de mamífero, por ejemplo CHO o NS0), produciendo moléculas de scFv funcionales (véase, por ejemplo, Rippmann et al., Applied and Environmental Microbiology 1998, 64(12): 4862-4869; Yamawaki et al., J. Biosci. Bioeng. 2007, 104(5): 403-407; Sonoda et al., Protein Expr. Purif. 2010, 70(2): 248-253).

30 En particular, las moléculas de scFv de la invención pueden producirse como se indica a continuación. Las construcciones pueden expresarse en diferentes cepas de *E. coli* tales como W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3) y MM294 bajo el control de un promotor inducible. Este promotor puede elegirse entre lacUV5, tac, T7, trp, trc, T5 y araB. Los medios de cultivo preferiblemente están completamente definidos de acuerdo con Wilms et al., 2001(Wilms et al., Biotechnology and Bioengineering 2001, 73(2): 95-103) , DeLisa et al., 1999 (DeLisa et al., Biotechnology and Bioengineering 1999, 65(1): 54-64) o equivalente. Sin embargo, puede ser beneficioso el suplemento del medio del lote y/o el medio de alimentación con aminoácidos tales como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina o componentes de medios complejos tales como peptona de soja o extracto de levadura. El proceso de fermentación se realiza en modo de lote alimentado. Condiciones: Temperatura 20 – 40 °C, pH 5,5 – 7,5, el valor de DO se mantiene por encima de 20%. Después del consumo de la fuente de carbono inicial, el cultivo se alimenta con el medio de alimentación indicado anteriormente (o equivalente). Cuando se alcanza un peso celular seco de 40 a 100 g/l en el fermentador, el cultivo se induce con un inductor apropiado que corresponde al sistema promotor usado (por ejemplo IPTG, lactosa, arabinosa). La inducción puede realizarse como una inducción completa pulsátil o como una inducción parcial mediante el suministro del inductor respectivo al fermentador durante un periodo de tiempo prolongado o una combinación de ambos métodos. La fase de producción debe durar al menos 4 horas. Las células se recuperan por centrifugación en decantadores centrífugos o decantadores centrífugos tubulares o centrífugas verticales, y se desecha el sobrenadante del cultivo.

45

La masa de células *E. coli* se resuspende en una cantidad de 4 a 8 veces mayor de tampón de lisis (tampón fosfato o Tris, pH 7-8.5). La lisis celular típicamente se realiza por homogeneización a alta presión seguido de recuperación del sedimento por centrifugación en un decantador centrífugo, decantador centrífugo tubular o centrífuga vertical. El sedimento que contiene cuerpos de inclusión de scFv se lava 2-3 veces con Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Urea 2 M, Tritón X-100 al 0,5%, pH 8,0 seguido de dos etapas de lavado usando Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0. Los cuerpos de inclusión de scFv finalmente se recuperan por centrifugación en decantadores centrífugos, decantadores centrífugos tubulares o centrífugas verticales. La solubilización de los cuerpos de inclusión de scFv puede realizarse en Glicina 100 mM/NaOH, EDTA 5 mM, ditiotreitól 20 mM, pH 9,5-10,5 que contiene agentes caotrópicos tales como Guanidina 6 M-HCl o Urea 8-10 mM. Después de la incubación durante 30-60 minutos, la solución se centrifuga y el sobrenadante que contiene la proteína diana se recupera para el repliegamiento posterior. El repliegamiento preferiblemente se realiza en modo de lote alimentado diluyendo la solución de proteína 1:10-1:50 en tampón de repliegamiento hasta una concentración final de proteína de 0,1-0,5 mg/ml. El tampón de repliegamiento puede contener Tris 50-100 mM y/o Glicina 50-100 mM, NaCl 50-150 mM, urea 1-3 M, arginina 0,5-1 M, y una concentración 2-6 mM de sistema redox tal como, por ejemplo, cisteína/cistina o

50

55

glutación oxidado/reducido, pH 9,5-10,5. Después de la incubación durante 24-72 h a 4°C, la solución de replegamiento opcionalmente se filtra usando un filtro de 0,22 µm, se diluye y el pH se ajusta a pH 7,0-8,0. La proteína se separa mediante cromatografía de intercambio catiónico en modo de unión (por ejemplo Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose FF o S HyperCel™) a pH 7,0-8,5. La elución se realiza mediante un gradiente de NaCl creciente lineal. Las fracciones que contienen la proteína diana se reúnen y posteriormente se separan en una columna de intercambio aniónico en modo de no unión (por ejemplo Toyopearl GigaCap Q-650M, Q-Sepharose FF, Q HyperCel™) seguido de una etapa de refinado de intercambio catiónico (por ejemplo SP Sepharose HP). Las fracciones que contienen la proteína diana con un nivel de pureza de 90% como mínimo se reúnen y se formulan por diafiltración o cromatografía de exclusión molecular en PBS. La identidad y la calidad del producto de la molécula de scFv producida se analizan mediante SDS-PAGE reductora en la que el scFv puede detectarse en una banda principal de aproximadamente 26 kDa. Otros ensayos para la caracterización del scFv incluyen espectrometría de masas, RP-HPLC y SE-HPLC.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina, preferiblemente una inmunoglobulina de tipo IgG1, o un knock-out de función efectora de la misma, o IgG4. En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina que tiene una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina que tiene una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina que tiene una cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 40, y una cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 35.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de Fab. En este formato, cada uno de los dominios variables descritos anteriormente puede fusionarse a un dominio constante de inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. De esta manera, el dominio variable de cadena pesada puede fusionarse a un dominio CH₁ (un denominado fragmento Fd), y el dominio variable de cadena ligera puede fusionarse a un dominio CL.

En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de Fab que tiene un fragmento de Fd que comprende SEQ ID NO: 36, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37. En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de Fab que tiene un fragmento de Fd que comprende SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37. En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de Fab que tiene un fragmento de Fd que comprende SEQ ID NO: 36, y una cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 37. En otro aspecto de la invención, la molécula de anticuerpo es una molécula de Fab que tiene un fragmento de Fd que comprende SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 39.

Pueden usarse ácidos nucleicos que codifican construcciones de Fab para expresar dichas cadenas pesada y ligera en células hospedadoras tales como E. coli, Pichia pastoris, o líneas celulares de mamífero (por ejemplo CHO, o NS0). En la técnica se conocen procesos que permiten un plegamiento apropiado, asociación y formación de enlaces disulfuro de estas cadenas en moléculas de Fab funcionales que comprenden un fragmento Fd y una cadena ligera (Burtet et al., J. Biochem. 2007, 142(6), 665-669; Ning et al., Biochem. Mol. Biol. 2005, 38: 204-299; Quintero-Hernandez et al., Mol. Immunol. 2007, 44: 1307-1315; Willems et al. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003;786:161-176.).

En particular, pueden producirse moléculas de Fab de la invención en células CHO como se indica a continuación. Se transfectan células CHO-DG44 (Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M., y Chasin, L.A. (1983). "Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells". Cell 33, 405-412.) que crecen en suspensión en medio sin suero, con construcciones de expresión que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de la molécula de Fab usando reactivo Lipofectamina™ y Plus™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, las células se someten a selección en medio que contiene 200 µg/ml del antibiótico G418 y sin hipoxantina y timidina para generar poblaciones celulares transfectadas de manera estable. Estos transfectantes estables posteriormente se someten a amplificación génica mediante la adición de metotrexato (MTX) en concentraciones crecientes (hasta 100 o 400 nM) al medio de cultivo. Una vez que se han adaptado las células, se someten a fermentaciones de lote alimentado durante 10 a 11 días para producir material proteico Fab.

Se incuban cultivos en suspensión de células CHO-DG44 y transfectantes estables de las mismas en medio de cultivo sin suero, definido químicamente. Los cultivos de stock de siembra se sub-cultivan cada 2-3 días con densidades de siembra de 3×10^5 – 2×10^5 células/ml, respectivamente. Las células se cultivan en matraces de agitación en incubadores Multitron HT (Infors) con 5% de CO₂, a 37°C y 120 rpm.

Para los experimentos de lote alimentado, las células se siembran a 3×10^5 células/ml en matraces de agitación en medio de producción patentado BI sin antibióticos o MTX. Se agitan los cultivos a 120 rpm a 37°C y 5% de CO₂, que se reduce después al 2% a medida que aumenta el número de células. Los parámetros de cultivo que incluyen el recuento celular, la viabilidad, el pH, y las concentraciones de glucosa y lactato se determinan diariamente y el pH se

ajusta a pH 7,0 usando lo que se necesite de carbonato. Se añade solución de alimentación patentada BI cada 24 h. Se recogen muestras del sobrenadante a diferentes puntos de tiempo para determinar la concentración de producto de Fab por ELISA. Después de 10 a 11 días, se recoge el fluido de cultivo celular por centrifugación y se transfiere a los laboratorios de purificación.

5 La molécula de Fab se purifica del sobrenadante de los cultivos de lote alimentado por medio de cromatografía y filtración. Como etapa de captura primaria, se aplica cromatografía de afinidad, por ejemplo, Proteína G o Proteína L. Como alternativa, en caso de bajas afinidades de unión y bajas capacidades, el Fab se captura por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) explotando el pI de la molécula. Las proteínas y los contaminantes de la célula hospedadora, por ejemplo ADN o virus, se retiran por etapas de purificación ortogonal adicionales.

10 La identidad y la calidad de producto de la molécula de Fab producida se analizan por métodos electroforéticos, por ejemplo SDS-PAGE, mediante la que el Fab puede detectarse como una banda principal de aproximadamente 50 kDa. Otros ensayos para la caracterización del producto de Fab incluyen espectrometría de masas, enfoque isoeléctrico y cromatografía de exclusión molecular. La actividad de unión se sigue mediante análisis BIAcore.

15 La cuantificación de las moléculas de Fab o de IgG de longitud completa en el sobrenadante de los cultivos celulares se realiza mediante ensayo en inmunoabsorbente ligado a enzima de tipo sándwich (ELISA). La IgG de longitud completa puede detectarse usando anticuerpos inducidos contra un fragmento Fc humano (Jackson Immuno Research Laboratories) y cadena ligera kappa humana (conjugada con peroxidasa, Sigma). El fragmento Fab se inmoviliza mediante IgG policlonal de cabra anti-Humana (H y L, Novus) y se detecta por anticuerpos policlonales de oveja inducidos contra IgG humana (conjugada con peroxidasa, The Binding Site).

20 También pueden generarse moléculas de Fab a partir de moléculas de anticuerpo de longitud completa por escisión enzimática. La ventaja de esta estrategia es que se pueden aplicar procesos de plataforma para una fermentación y purificación sólida y eficaz que son susceptibles del aumento a escala y altos rendimientos en la calidad del producto deseada. Para la purificación por cromatografía de afinidad, puede usarse una resina de Proteína A recombinante como etapa de captura primaria que normalmente da como resultado altas purezas.

25 Para este fin, las secuencias de Fab que codifican cadenas pesadas se fusionan a la región Fc de una molécula de anticuerpo IgG humana. Las construcciones de expresión resultantes después se introducen por transfección en células CHO-DG44 que crecen en suspensión en medio sin suero usando lipofección. Después de 48 horas, las células se someten a selección en medio que contiene 200 μ g/ml del antibiótico G418 y sin hipoxantina y timidina para generar poblaciones celulares transfectadas de manera estable. Estos transfectantes estables posteriormente se someten a amplificación génica mediante la adición de metotrexato (MTX) en concentraciones crecientes (hasta 100 o 400 nM) al medio de cultivo. Una vez que se han adaptado las células, se someten a fermentaciones de lote alimentado durante 10 a 11 días para producir material proteico IgG.

35 La proteína IgG se purifica del sobrenadante de cultivo usando cromatografía de afinidad con Proteína A recombinante. Para obtener el fragmento Fab neutralizador deseado, la IgG de longitud completa después se incuba en presencia de papaína, que escinde la IgG dentro de la región de bisagra, liberando de esta manera dos fragmentos Fab y el resto Fc. Una molécula de Fab que comprende una cadena de Fd de SEQ ID NO: 41 es un ejemplo de una molécula de Fab obtenida por digestión con papaína de una proteína IgG de longitud completa.

40 La molécula de Fab se aísla por cromatografía de afinidad, por ejemplo Proteína G o Proteína L. Como alternativa, en caso de bajas afinidades de unión y bajas capacidades, el Fab se captura por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) explotando el pI de la molécula. Las proteínas y los contaminantes de la célula hospedadora, por ejemplo, papaína, ADN o virus, se retiran por etapas de purificación ortogonal adicionales.

En otro aspecto de la descripción, la molécula de anticuerpo es una variante de secuencia de aminoácidos de una molécula de anticuerpo como se describe en el presente documento.

45 Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Estas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de los ejemplos proporcionados en la presente memoria. Se realiza cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para conseguir la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos postraduccionales del anticuerpo humanizado o variante, tal como cambiando el número de posición de sitios de glicosilación.

50 Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis mediante alanina," como se describe por Cunningham y Wells (Science, 244:1081-1085 (1989)). En este caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (típicamente alanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Después se refinan las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones mediante la introducción de variantes adicionales u otras variantes en o para sitios de sustitución. De esta manera, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácido está predeterminado, no necesita predeterminarse la

naturaleza de la mutación per se. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis mediante alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se exploran las variantes de anticuerpo expresadas con respecto a la actividad deseada.

5 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno solo o múltiples restos aminoacídicos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo fusionado a un marcador de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen una fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

10 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto aminoacídico en la molécula de anticuerpo retirada y un resto diferente insertado en su sitio. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. En la Tabla proporcionada a continuación se proporcionan sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si estas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares", o como se describe más adelante en relación con las clases de aminoácidos, y pueden explorarse los productos.

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	arg; asn; gln; lys;	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	ile; norleucina; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	phe;trp; thr; ser	phe
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; norleucina;	leu

20 En la química de proteínas, generalmente está aceptado que las propiedades biológicas del anticuerpo pueden conseguirse mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófoba: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófila neutra: cys, ser, thr;
- (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gin, his, lys, arg;
- 5 (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas incluirán cambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

10 También puede sustituirse cualquier resto de cisteína no implicada en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo humanizado o variante, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula, prevenir el entrecruzamiento aberrante o proporcionar puntos de conjugación establecidos con un compuesto citotóxico o citostático. Por el contrario, puede añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

15 Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán mejores propiedades biológicas que el anticuerpo parental a partir del cual se generaron. Una forma conveniente para generar estas variantes de sustitución es mediante maduración de afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se hacen mutar varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo 6-7

20 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se manifiestan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III del fago M13 empaquetados dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos después se exploran con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar sitios de regiones hipervariables candidatas para la modificación, puede realizarse mutagénesis mediante alanina para

25 identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y Dabigatrán humano. Estos restos de contacto y los restos próximos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez que se han generado estas variantes, el panel de variantes se somete a la exploración como se describe en la presente memoria y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos

30 relevantes para un desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por "alteración" se entiende la delección de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

35 En algunas realizaciones, puede ser deseable modificar los anticuerpos de la invención para añadir sitios de glicosilación. La glicosilación de los anticuerpos típicamente es una N-glicosilación o una O-glicosilación. N-glicosilación se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea

40 un sitio de glicosilación potencial. La O-glicosilación se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. De esta manera, para glicosilar una proteína dada, por ejemplo un anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica por ingeniería genética para que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de N-glicosilación). La alteración también

45 puede realizarse mediante la adición de, o la sustitución de, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de O-glicosilación).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos se preparan por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante

50 mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada previamente o una versión no variante de una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria. Como se ha indicado anteriormente, el antígeno de la molécula de anticuerpo de la invención es un anticoagulante. El antígeno se usa para generar la molécula de anticuerpo, por inmunización de un animal o por selección de secuencias de anticuerpo a partir de bibliotecas de secuencias, como ocurre con los métodos de

55 presentación en fagos.

Los protocolos de inmunización para animales son bien conocidos en la técnica. Para conseguir una respuesta

inmune apropiada, puede ser necesario combinar el antígeno con un adyuvante, tal como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, escualeno, o adyuvante completo/incompleto de Freund.

5 Los antígenos en el contexto de la presente invención, tal como dabigatrán, son en su mayor parte similares a moléculas orgánicas pequeñas, que algunas veces no estimulan la formación de anticuerpos tras la administración a un animal. Por lo tanto, puede ser necesario unir el antígeno a una macromolécula, tal como un hapteno.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente para uso en medicina.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéutico.

10 Para ser usada en terapia, la molécula de anticuerpo se incluye en composiciones farmacéuticas apropiadas para facilitar la administración a animales o a seres humanos. Pueden prepararse formulaciones típicas de la molécula de anticuerpo mezclando la molécula de anticuerpo con vehículos, excipientes o agentes estabilizantes fisiológicamente aceptables, en forma de formulaciones liofilizadas o secadas de cualquier otra forma, disoluciones acuosas o suspensiones acuosas o no acuosas. Los vehículos, excipientes, agentes modificadores o agentes estabilizantes no
15 son tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Incluyen sistemas tampón tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos o inorgánicos y sus sales; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; agentes conservantes tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil-parabenos tales como metil o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona o polietilenglicol (PEG); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, sacarosa, trehalosa, dextrinas o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos iónicos o no
20 iónicos tales como TWEEN™ (polisorbatos), PLURONICS™ o ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos o ésteres de azúcares. En la formulación del anticuerpo también pueden estar contenidos disolventes orgánicos tales como etanol o isopropanol. Los excipientes también pueden tener una función modificadora de la liberación o de la absorción.

25 En un aspecto, la composición farmacéutica comprende la molécula de anticuerpo en una solución acuosa tamponada a una concentración de 10-20 mg/ml, o un liofilizado preparado a partir de dicha solución.

El modo preferido de aplicación es parenteral, por infusión o inyección (intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica), pero también pueden ser aplicables otros modos de aplicación tales como por inhalación, transdérmico, intranasal, bucal u oral.

35 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente para uso en la terapia o profilaxis de efectos secundarios de terapia anticoagulante, en particular episodios hemorrágicos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo como se ha descrito antes para uso en la inversión de una sobredosificación de dabigatrán o dabigatrán etexilato.

40 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo como se ha descrito antes para uso como un antídoto de un anticoagulante, a saber dabigatrán o dabigatrán etexilato.

En un aspecto adicional, la presente memoria se refiere a un método de tratamiento de efectos secundarios de una terapia anticoagulante, que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente a un paciente que lo necesita.

45 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere al uso del anticuerpo en un método de tratamiento de un episodio de sobredosificación en terapia con dabigatrán, que comprende administrar una cantidad eficaz de una molécula de anticuerpo como se ha descrito anteriormente a un paciente en necesidad de ello.

50 La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo a administrar es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar los efectos secundarios de una terapia anticoagulante, en particular, la cantidad mínima que es eficaz para detener la hemorragia. Esto puede conseguirse con cantidades estequiométricas de molécula de anticuerpo.

55 El dabigatrán, por ejemplo, puede alcanzar una concentración en plasma en la magnitud de 200 nM cuando se administra a la dosis recomendada. Cuando se usa una molécula de anticuerpo monovalente con un peso molecular de aproximadamente 50 kdal, la neutralización puede conseguirse, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 1 mg/kg, cuando se administra por vía intravenosa como una inyección en embolada. En otra realización, la dosis de una molécula de Fab aplicada a un paciente humano puede ser de 50-1000 mg por aplicación, por ejemplo 100, 200,

500, 750 o 1000 mg. Dependiendo de la situación, p.ej., cuando el paciente ha recibido una sobredosis de dabigatrán, puede ser adecuado aplicar una dosis incluso más alta, p.ej. 1250, 1500, 1750 o 2000 mg por aplicación. La dosis apropiada puede ser diferente, dependiendo del tipo y dosis de anticoagulante administrado, el tiempo transcurrido desde dicha administración, la naturaleza de la molécula de antígeno, el estado del paciente, y otros factores. El experto en la materia conoce métodos para establecer dosis que son tanto terapéuticamente eficaces como seguras.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo con afinidad de unión a dabigatrán y/o dabigatrán etexilato. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se une al dabigatrán y/o dabigatrán etexilato con una afinidad, determinada, por ejemplo, por análisis de resonancia de plasmón de superficie (Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics." *Curr Opin Immunol.* 1993 Apr;5(2):282-6.) o tecnología de exclusión cinética (KinExA) (Darling, R.J., and Brault P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2004, Dec 2(6): 647-657), con un valor de K_D que varía de 0,1 pM a 100 μ M, preferiblemente 1 pM a 100 μ M, más preferiblemente de 1 pM a 1 μ M.

Las moléculas de anticuerpo de la invención también pueden usarse para procedimientos analíticos y de diagnóstico, por ejemplo para determinar la concentración de antígenos en muestras tales como plasma, suero u otros fluidos corporales. Por ejemplo, las moléculas de antígeno pueden usarse en un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), tal como los descritos en los ejemplos. De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere a kits de diagnóstico y analíticos que comprenden moléculas de anticuerpo como las descritas en la presente memoria, y a métodos analíticos y de diagnóstico respectivos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para fabricar una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende

- (a) proporcionar una célula hospedadora que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican dicha molécula de anticuerpo en asociación funcional con una secuencia de control de la expresión,
- (b) cultivar dicha célula hospedadora, y
- (c) recuperar la molécula de anticuerpo del cultivo celular.

La descripción proporciona además un artículo de fabricación y kit que contiene materiales útiles para la neutralización de anticoagulantes orales, particularmente inhibidores directos de trombina. El artículo de fabricación comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio, metal, plástico o combinaciones de los mismos. El recipiente contiene una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo descrito en la presente memoria o dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El agente activo en la composición farmacéutica es el anticuerpo particular o dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La etiqueta en el recipiente del anticuerpo indica que la composición farmacéutica se usa para neutralizar o neutralizar parcialmente dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo in vivo.

El kit comprende uno o más de los recipientes descritos anteriormente. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas e insertos de paquete con instrucciones de uso.

En una realización de la invención, el kit comprende un anticuerpo de uno cualquiera de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones o una composición farmacéutica de los mismos. Por ejemplo, el kit puede comprender (1) uno cualquiera de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones o una composición farmacéutica del mismo, (2) un recipiente y (3) una etiqueta.

En otra realización, el kit comprende un anticuerpo de uno cualquiera de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones o una composición farmacéutica del mismo, y dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La forma de dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede estar en forma de un sólido, líquido o gel. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable de dabigatrán etexilato es una sal mesilato. En otra realización preferida más, la furza por unidad de dosificación de dabigatrán, dabigatrán etexilato, profármaco de dabigatrán o sal farmacéuticamente aceptable del mismo está entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 400 mg, aproximadamente 75 mg y aproximadamente 300 mg, aproximadamente 75 mg y 150 mg, o aproximadamente 110 mg y aproximadamente 150 mg, administrados una vez al día (QD) o dos veces al día (BID). Por ejemplo, el kit puede comprender (1) uno cualquiera de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones o una composición farmacéutica del mismo, (2) una composición farmacéutica de dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (3) un recipiente y (4) una etiqueta.

En una realización alternativa, el kit comprende (1) una primera composición farmacéutica que comprende dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (2) una segunda composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los anticuerpos según las reivindicaciones o combinación de los mismos (3) instrucciones para la administración separada de dichas primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente, donde dichas primera y segunda composiciones farmacéuticas están contenidas en recipientes separados y dicha segunda composición farmacéutica se administra a un paciente que requiere neutralización o neutralización parcial de dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán.

La descripción proporciona también un método de diagnóstico para neutralizar o neutralizar parcialmente dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán en un paciente que se trata con dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, que comprende administrar uno cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, una combinación de los mismos o una composición farmacéutica de los mismos. Específicamente, la invención proporciona un método para neutralizar o neutralizar parcialmente dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán en un paciente que comprende las etapas de (a) confirmar que un paciente estaba siendo tratado con dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la cantidad que fue tomada por el paciente; (b) neutralizar dabigatrán o 1-O-acilglucurónido con uno cualquiera de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones o combinación de los mismos antes de realizar un ensayo de coagulación en el que dabigatrán o el 1-O-acilglucurónido de dabigatrán interferiría con la lectura exacta de los resultados de la prueba o del ensayo; (c) realizar el ensayo de coagulación sobre una muestra tomada del paciente para determinar el nivel de formación de coágulos sin dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán presente; y (d) ajustar una cantidad de dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo administrada al paciente con el fin de lograr el equilibrio apropiado entre la formación de coágulos y la degradación en un paciente. La relación molar de anticuerpo a dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán está en la relación molar de entre 0,1 y 100, preferiblemente entre 0,1 y 10. La lectura precisa del resultado de la prueba o ensayo puede ser una lectura precisa de los niveles de fibrinógeno, resistencia a proteína C activada o pruebas relacionadas.

Ejemplos

I. Producción de anticuerpos policlonales anti-dabigatrán

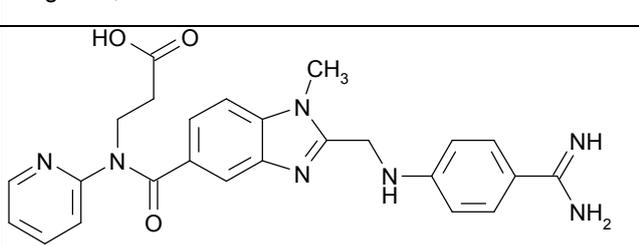
Para la producción de anticuerpos policlonales anti-dabigatrán, se produjeron 3 inmunógenos diferentes con dos haptenos diferentes y diferentes relaciones molares de entrada del hapteno y la proteína de soporte (BSA).

Para la exploración, se produjo un conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se realizó un ensayo de enzima-inmunoabsorbente (ELISA).

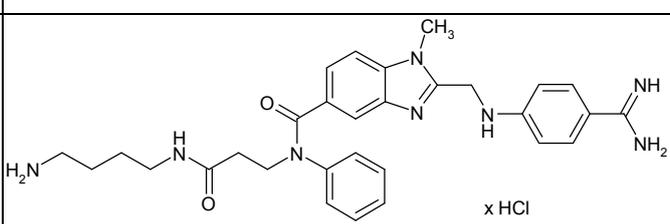
La purificación adicional de los anticuerpos policlonales se realizó por cromatografía de afinidad en proteína A sepharose FF.

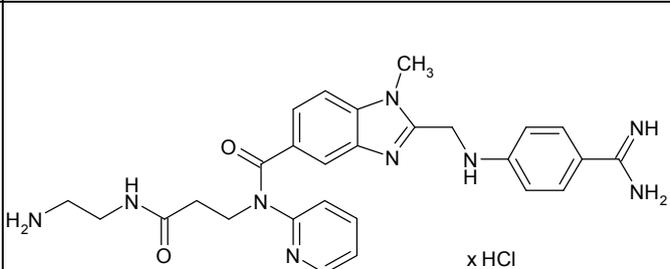
1. Materiales y métodos

35 Compuesto de ensayo (dabigatrán)

Código:	dabigatrán, zwitterión
Fórmula estructural	 <p>$C_{25}H_{25}N_7O_3$ peso molecular: 471,5 g/mol</p>

1.1 Hapteno usado para la síntesis de inmunógeno y trazador

Código:	Hapteno1
Fórmula estructural de ligando:	 <p style="text-align: right;">x HCl</p> <p>$C_{30}H_{36}N_8O_2$ peso molecular: 577,13 g/mol</p> <p style="text-align: right;">HCl</p>

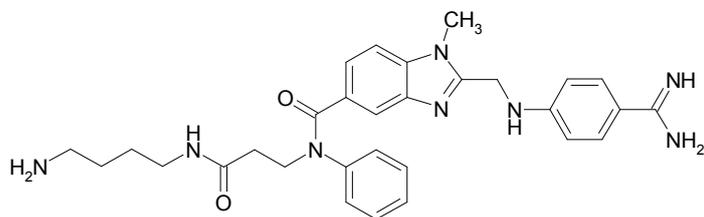
Código:	Hapteno2
Fórmula estructural de ligando:	 <p style="text-align: right;">x HCl</p> <p>$C_{27}H_{31}N_9O_2$ peso molecular: 550,07 g/mol</p> <p style="text-align: right;">HCl</p>

5

1.2 Síntesis de haptenos

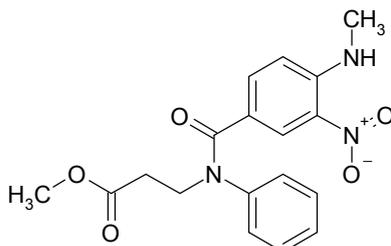
Los haptenos Hapteno1 y Hapteno2 se sintetizaron como se indica a continuación:

Hapteno 1: [2-(4-Amino-butilcarbamoil)-etil]-fenil-amida del ácido 2-[4-carbamimidoil-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico



10

1a Éster metílico del ácido 3-[(4-Metilamino-3-nitro-benzoil)-fenil-amino]-propiónico



A una solución de cloruro del ácido 4-metilamino-3-nitro-benzoico (23,3 mmol) y éster metílico del ácido 3-fenil-

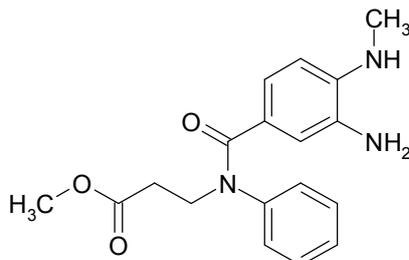
amino-propiónico (23,3 mmol) en 80 ml de tetrahidrofurano seco (THF) se le añadió gota a gota trietilamina (50,2 mmol) con agitación a temperatura ambiente. Después de tres horas, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el sólido restante se trituró con agua y el producto sólido se aisló por filtración.

Rendimiento: 99%

5 $C_{18}H_{19}N_3O_5$ (357,36)

TLC (gel de sílice; 19:1 de Diclorometano/etanol): $R_f = 0,48$

1b Éster metílico del ácido 3-[(3-amino-4-metilamino-benzoil)-fenil-amino]-propiónico



10 El grupo nitro del producto 1a se redujo por hidrogenación a temperatura ambiente en etanol con Pd (al 10% sobre carbón vegetal) como catalizador.

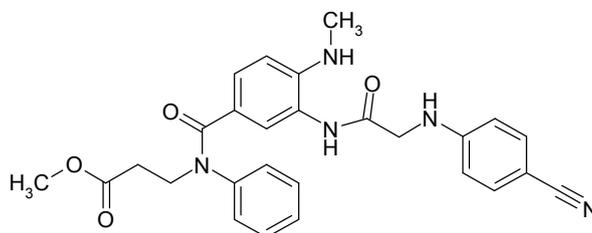
Rendimiento: 99%

$C_{18}H_{21}N_3O_3$ (327,38)

TLC (gel de sílice; 9:1 de Diclorometano/etanol): $R_f = 0,23$

Espectro de masas (ESI): $[M+H]^+ = 328$

15 1c Éster metílico del ácido 3-({3-[2-(4-ciano-fenilamino)-acetilamino]-4-metilamino-benzoil}-fenil-amino)-propiónico



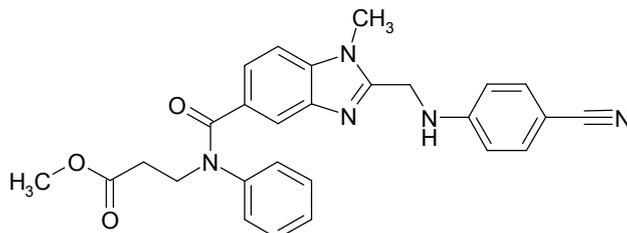
El producto de 1b (23,2 mmol) y N-(4-ciano-fenil)-glicina (23,2 mmol) se acoplaron con CDI (23,2 mmol) en THF seco a temperatura ambiente. Después de que se completara la reacción, la mezcla se evaporó a sequedad y el producto en bruto se usó sin purificación adicional.

20 Rendimiento: 97%

$C_{27}H_{27}N_5O_4$ (485,54)

Espectro de masas (ESI): $[M+H]^+ = 486$

1d Éster metílico del ácido 3-({2-[(4-ciano-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzoimidazol-5-carbonil}-fenil-amino)-propiónico



25

Una solución del producto de 1c (22,6 mmol) en 100 ml de ácido acético concentrado se calentó a reflujo durante

una hora. Después, la solución se evaporó a sequedad, el sólido restante se trituroó con agua y, con agitación, el pH se ajustó a aproximadamente 8-9. El producto en bruto se aisló por extracción con acetato de etilo y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: 1:1 de diclorometano/etanol).

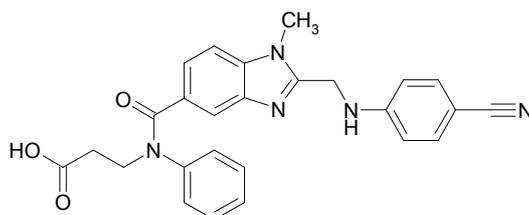
Rendimiento: 58%

5 $C_{27}H_{25}N_5O_3$ (467,52)

TLC (gel de sílice; 9:1 de Diclorometano/etanol): $R_f = 0,71$

Espectro de masas (ESI): $[M+H]^+ = 468$

1e Ácido 3-({2-[(4-ciano-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzimidazol-5-carbonil}-fenil-amino)-propiónico



10 A una solución del producto de 1d (13,0 mmol) en 100 ml de metanol se le añadió hidróxido sódico (20,0 mmol). La mezcla se agitó durante 2,5 horas a 40°C y después se evaporó a sequedad. El sólido restante se agitó con 100 ml de agua y el pH se ajustó a aproximadamente 6 con ácido acético concentrado. El producto precipitado se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó a 60°C.

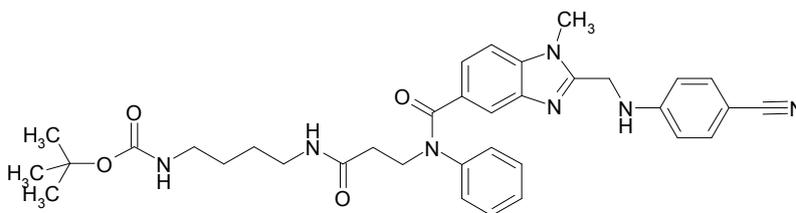
Rendimiento: 88%

15 $C_{26}H_{23}N_5O_3$ (453,49)

TLC (gel de sílice; 9:1 de Diclorometano/etanol): $R_f = 0,33$

Espectro de masas (ESI): $[M+H]^+ = 454$

1f Éster terc-butílico del ácido {4-[3-({2-[(4-ciano-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzimidazol-5-carbonil}-fenil-amino)-propionilamino]-butil}-carbámico



20 Una solución del producto de 1e (5,23 mmol), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU, 5,23 mmol) y N-metil-morfolina (5,23 mmol) en 20 ml de DMF se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se añadió éster terc-butílico del ácido (4-amino-butil)-carbámico (5,23 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas más. Después, la mezcla se diluyó con agua (100 ml) y el producto se aisló por extracción con acetato de etilo.

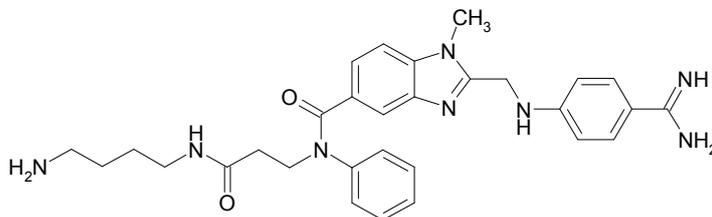
25

Rendimiento: 92%

$C_{35}H_{41}N_7O_4$ (623,75)

TLC (gel de sílice; 9:1 de Diclorometano/etanol): $R_f = 0,51$

1g [2-(4-Amino-butylcarbamoyl)-etil]-fenil-amida del ácido 2-[(4-carbamimidoyl-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzoimidazol-5-carboxílico



5 El producto de 1f (4.81 mmol) se disolvió en una solución saturada de HCl en etanol (250 ml), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche y después se evaporó a sequedad a 30°C. El material en bruto restante se disolvió en 200 ml de etanol seco, después se añadió carbonato de amonio (48,1 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de la evaporación del disolvente, el material en bruto restante se trituró con aprox. 5 ml de etanol, el material no disuelto se separó por filtración y el disolvente se evaporó a 30°C. Después, el producto se disolvió en 30 ml de agua, la solución se agitó con aprox. 2 g de carbón vegetal, se filtró y se evaporó a sequedad.

Rendimiento: 90%

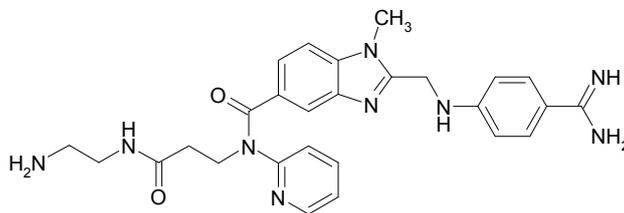
$C_{30}H_{36}N_8O_2$ (540,67)

TLC (fase inversa RP-8; 9:1 de metanol/solución acuosa al 5% de NaCl): $R_f = 0,79$

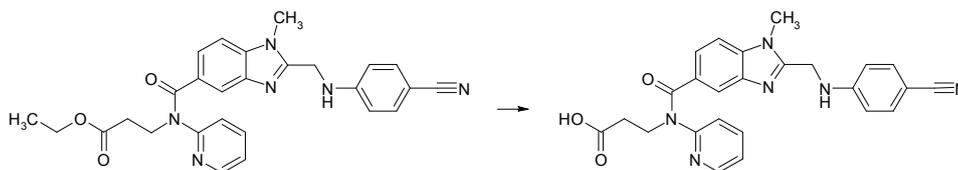
Espectro de masas (ESI): $[M+H]^+ = 541$

15 $[M+Cl]^- = 575/7$

Hapteno 2: [2-(2-Amino-etilcarbamoyl)-etil]-piridin-2-il-amida del ácido 2-[(4-carbamimidoyl-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzoimidazol-5-carboxílico



2a Ácido 3-({2-[(4-ciano-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzoimidazol-5-carbonil}-piridin-2-il-amino)-propiónico

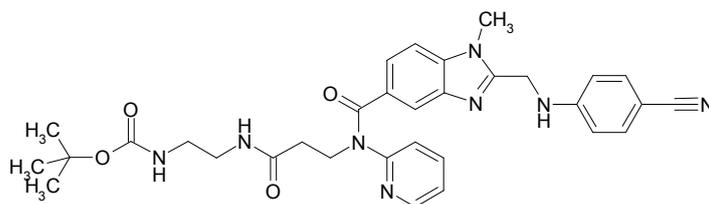


20 A una solución de hidróxido sódico (50,0 mmol) en 500 ml de etanol y 50 ml de agua se le añadió éster etílico del ácido 3-({2-[(4-ciano-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzoimidazol-5-carbonil}-piridin-2-il-amino)-propiónico (41,4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante tres horas, después se retiraron por destilación aprox. 350 ml de etanol, se añadieron aprox. 100 ml de agua y el pH se ajustó a 6. Después, se añadió éter dietílico (50 ml) y la mezcla se agitó durante una noche. El producto se aisló por filtración y se usó sin purificación adicional.

Rendimiento: 78%

$C_{25}H_{22}N_6O_3$ (454,48)

2b Éster terc-butílico del ácido {2-[3-({2-[(4-ciano-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzotriazol-5-carbonil}-piridin-2-il-amino)-propionilamino]-etil}-carbámico



5 Una solución del producto de 2a (2,20 mmol), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU, 2,20 mmol) y N-metil-morfolina (2,20 mmol) en tetrahidrofurano seco (100 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se añadió éster terc-butílico del ácido (2-amino-etil)-carbámico (2,20 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas más. Después, la mezcla se diluyó con 40 ml de agua, el producto se aisló por extracción con acetato de etilo y se purificó por cromatografía (gel de sílice; 15:1 de diclorometano/metanol).

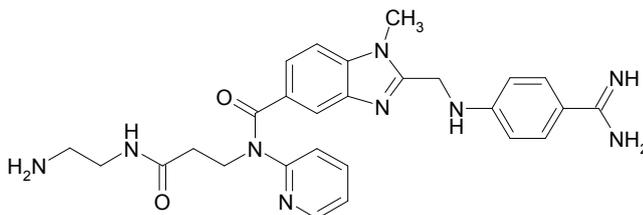
10 Rendimiento: 61%

$C_{32}H_{36}N_8O_4$ (596,68)

Espectro de masas (ESI): $[M+H]^+ = 597$

$[M+H]^- = 595$

15 2c [2-(2-Amino-etilcarbamoil)-etil]-piridin-2-il-amida del ácido 2-[(4-carbamimidoil-fenilamino)-metil]-1-metil-1H-benzotriazol-5-carboxílico



20 El producto de 2b (1,34 mmol) se añadió a una solución saturada de HCl en etanol seco (30 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y después se evaporó a sequedad a 30°C. Se añadieron etanol (30 ml) y carbonato de amonio (13,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, el disolvente se evaporó, el material residual se trituroó 5 veces con aprox. 4 ml de una mezcla de diclorometano/metanol (30:1), se filtró y se evaporó con el fin de separar el producto de las sales inorgánicas.

Rendimiento: 27%

$C_{27}H_{31}N_9O_2$ (513,61)

Espectro de masas (ESI): $[M+Cl]^- = 548/50$

25 $[M+HCl+Cl]^- = 584/6$

$[M+H]^+ = 514$

ES 2 614 992 T3

2. Compuestos químicos

2.1 Compuestos químicos para la síntesis de reactivos

Nombre	Descripción	Proveedor	Nº de catálogo
1,4-Benzoquinona		Fluka	12309
Albúmina de Suero Bovino (BSA)		Serva	11920
1,1'-Carbonil-di-(1,2,4-triazol)		Fluka	21861
Ácido cítrico	calidad analítica	Riedel-De Haën	33114
N,N- dimetilformamida (DMF)	para síntesis	Merck	822275
Etanol	calidad analítica	Baker	8006
adyuvante de Freund (CFA)	Completo	Sigma	F-5881
adyuvante de Freund (IFA)	Incompleto	Sigma	F-5506
Glicerina	Pura	Merck	104093
peroxidasa de rábano picante HRP	25000 U/100 mg	Boehringer Mannheim	108090
H ₂ SO ₄	calidad analítica	Riedel-De Haën	30743
KH ₂ PO ₄	calidad analítica	Merck	4873
NaHCO ₃	calidad analítica	Merck	106329
Na ₂ CO ₃	calidad analítica	Merck	106392
(NH ₄) ₂ SO ₄	calidad analítica	Merck	101217
o-fenilen diamina	comprimido de 30 mg	Sigma	P8412
Perborato sódico	Puro	Riedel-De Haën	11621
Timol	Puro	Merck	8167

ES 2 614 992 T3

2.2 Compuestos químicos para ELISA

Nombre	Descripción	Proveedor	Nº de catálogo
Ácido cítrico	calidad analítica	Riedel-De Haën	33114
H ₂ SO ₄	calidad analítica	Riedel-De Haën	30743
KH ₂ PO ₄	calidad analítica	Merck	4873
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	calidad analítica	Merck	6580
NaCl	calidad analítica	Merck	6404
NaOH	calidad analítica	Merck	6498
o-fenilen diamina	comprimido de 30 mg	Sigma	P8412
Perborato sódico	Puro	Riedel-De Haën	11621
Tween 20	Puro	Serva	37470

2.3 Tampones para ELISA

Nombre	Ingredientes	Uso
tampón 1 estabilidad:	Na ₂ HPO ₄ 0,05 M/KH ₂ PO ₄ NaCl 0,15 M, pH = 7,4 4 semanas a aproximadamente +4°C	revestimiento
tampón 2 estabilidad:	como tampón 1, con 5 g/l de BSA 10 días a aproximadamente +4°C	tampón de ensayo
tampón 3 estabilidad:	como tampón 1, con 5 g/l de BSA y 0,1 g/l de timerosal 4 semanas a aproximadamente +4°C	bloqueo de microplacas; almacenamiento
tampón 4 estabilidad:	ácido cítrico 0,1 M, ajustado a pH 5,0 con NaOH, 6,5 mmol/l de perborato sódico ácido cítrico: 6 meses a aproximadamente +4°C con perborato: 10 días a aproximadamente +4°C	tampón sustrato para o-fenilen diamina
solución de lavado estabilidad:	agua, 0,5 g/l de Tween 20 10 días a temperatura ambiente	lavado de microplacas
reactivo de interrupción estabilidad:	H ₂ SO ₄ 2,25 M 5 años a temperatura ambiente	detiene el desarrollo de color de o-fenilen diamina

Se usó agua de un sistema de procesamiento de agua ultrapura Elgastat Maxima-HPLC para preparar soluciones tampón.

3. Síntesis de inmunógenos

5 Para estimular el sistema inmune de conejos para producir anticuerpos policlonales contra dabigatrán, se sintetizaron tres inmunógenos (lotes nº **GL256**, **GL258** y **GL262**) mediante acoplamiento de los haptenos HAPTENO1 y HAPTENO2 a la proteína de soporte albúmina de suero bovino (BSA) usando 1,4-benzoquinona o 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) como reactivo de acoplamiento.

10 Para la síntesis de GL256, se usó 1,4-benzoquinona como compuesto homobifuncional con dos sitios reactivos. Primero reacciona a un pH ácido con grupos amino sólo en uno de los dos sitios y a un pH alcalino en el otro sitio con una polimerización mínima.

GL258 y GL262 se sintetizaron usando 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) como reactivo de acoplamiento con diferentes relaciones de entrada del hapteno en la proteína de soporte.

3.1 Síntesis de GL256

15 A la solución de BSA 0,75 µMol en 8,5 ml de tampón KH_2PO_4 0,1 M (pH = 4,5) se le añadió 1,4-benzoquinona 0,416 mmol (en 1,5 ml de etanol) y se incubó durante 1,5 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Después, la solución atravesó una columna sephadex G25 equilibrada en NaCl 0,15 M para eliminar el exceso de 1,4-benzoquinona (volumen final 12,5 ml).

20 Se añadieron lentamente 2,5 ml (0,15 µMol) de la solución de BSA purificada con agitación a una solución del hapteno HAPTENO1 525 µMol disuelto en 2 ml de tampón NaHCO_3 0,1 M/ Na_2CO_3 (pH = 8,5). Durante la adición de la solución de BSA, el pH se ajustó a aproximadamente 8,0. La relación molar de entrada del hapteno y la proteína de soporte fue 3500:1.

Después de la incubación a temperatura ambiente durante una noche, el inmunógeno se dializó 6 veces frente a 1 litro de agua dest. La cromatografía de capa fina mostró que no quedaba ninguna mancha de hapteno no unido en los conjugados hapteno-vehículo.

25 El inmunógeno se almacenó congelado en alícuotas a -20°C. El grado de sustitución de BSA con hapteno en el sobrenadante del inmunógeno fue de aproximadamente 1:18 según se determinó por espectrometría de absorción UV a 302 nm. El contenido de inmunógeno en la solución final fue de 0,75 mg de GL256/ml

3.2 Síntesis de GL258

30 Se preparó una solución de HAPTENO2 158 µMol en 6,3 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente. Se añadió 1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) 158 µMol y se incubó primero durante 4 horas a 10°C y después durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción química se comprobó con cromatografía de capa fina y fue de aproximadamente 20-25%.

35 Después, se disolvió BSA 0,75 µMol en 2 ml de NaHCO_3 0,13 M y se añadió gota a gota 1 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) con agitación. El pH se ajustó a aproximadamente 8,3. Después, se añadieron gota a gota la solución de hapteno (6,3 ml) y 4 ml de NaHCO_3 0,13 M a la solución de BSA con agitación y el pH se ajustó a 8,4. La relación molar de entrada del hapteno y la proteína vehículo fue de 210:1 para el inmunógeno GL258.

Después de la incubación a temperatura ambiente en condiciones de agitación durante una noche, el inmunógeno se dializó 6 veces frente a 1 litro de agua dest. La cromatografía de capa fina mostró que no quedaba ninguna mancha de hapteno no unido en los conjugados hapteno-vehículo.

40 El inmunógeno se almacenó congelado en alícuotas a -20°C. El grado de sustitución de BSA con hapteno en el sobrenadante del inmunógeno fue de aproximadamente 1:5 según se determinó por espectrometría de absorción UV a 302 nm. El contenido de inmunógeno en la solución final fue de 0,28 mg de GL258/ml.

3.3 Síntesis de GL262

45 Se preparó una solución de HAPTENO2 225 µMol en 8,75 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente. Se añadió 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) 225 µMol y se incubó durante 4 horas a 10°C. La reacción química se comprobó con cromatografía de capa fina y fue de aproximadamente 20-25%.

50 Después, se disolvió BSA 0,49 µMol en 2 ml de NaHCO_3 0,13 M y se añadió gota a gota 1 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) con agitación. El pH se ajustó a aproximadamente 8,2. Después, se añadieron gota a gota la solución de hapteno (8,75 ml) y 6 ml de NaHCO_3 0,13 M a la solución de BSA con agitación y el pH se ajustó a 8,3. La relación molar de entrada del hapteno y la proteína vehículo fue de 460:1 para el inmunógeno GL262.

Después de la incubación a temperatura ambiente en condiciones de agitación durante una noche, el inmunógeno

se dializó 6 veces frente a 1 litro de agua dest. La cromatografía de capa fina mostró que no quedaba ninguna mancha de hapteno no unido en los conjugados hapteno-vehículo.

El inmunógeno se almacenó congelado en alícuotas a -20°C. El grado de sustitución de BSA con hapteno en el sobrenadante del inmunógeno fue de aproximadamente 1:32 según se determinó por espectrometría de absorción UV a 302 nm. El contenido de inmunógeno en la solución final fue de 0,71 mg de GL262/ml

4. Síntesis de conjugado

4.1 Síntesis de GL261

Se preparó una solución de HAPTENO2 37,4 µMol en 1,5 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente. Se añadió 1,1'-carbonil-di-(1,2,4-triazol) 37,5 µMol y se incubó primero durante 4 horas a 10°C y después durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción química se comprobó con cromatografía de capa fina y fue de aproximadamente 20-25%.

Después, se añadió enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) 1,125 µMol en 0,4 ml de NaHCO₃ 0,13 M y se añadieron gota a gota 0,267 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) con agitación. El pH se ajustó a aproximadamente 8,2. Después, se añadieron gota a gota 0,9 ml de la solución de hapteno (22,5 µMol) y 0,57 ml de NaHCO₃ 0,13 M a la solución de HRP con agitación y el pH se ajustó a 8,4. La relación molar de entrada del hapteno y la HRP fue 20:1 para el conjugado de HRP GL261.

Después de la incubación a temperatura ambiente durante una noche en condiciones de agitación, el conjugado de HRP se separó de los disolventes orgánicos y el exceso de hapteno por cromatografía en gel. La solución atravesó una columna sephadex G25 equilibrada con tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0.

La concentración final del conjugado hapteno-HRP (marcador, 5,64 mg/ml) se fijó con BSA, produciendo una concentración de aproximadamente 10 mg/ml, un volumen igual de glicerina para prevenir la congelación y un cristal de timol para prevenir el crecimiento de bacterias. La solución de trazador se etiquetó como n° de lote GL261 y se almacenó en alícuotas a -20°C.

El grado de sustitución de HRP con hapteno fue 1:0.2 según se determinó por espectroscopía UV a 302 nm.

La actividad específica del marcador se midió en placas de microtitulación bloqueadas con BSA usando o-fenilendiamina (OPD) como sustrato y HRP nativo como material de referencia. La mezcla de patrones de HRP diluidos o el conjugado de hapteno-HRP y solución de sustrato se incubaron durante 30 min en la oscuridad, la reacción se detuvo con ácido sulfúrico y la absorción se midió a 490 nm. La actividad que quedaba fue 94% de la HRP nativa y la actividad específica de la formulación de conjugado en glicerina fue de 611 U/ml.

Resumen de especificaciones de trazador:

tipo:	HAPTENO2 - peroxidasa de rábano picante (lote n° GL 261)
contenido de proteína:	5,64 mg/mL
actividad específica:	108 U/mg 611 U/ml (Sustrato Guayacol y H ₂ O ₂ , 25°C)
almacenamiento:	a aproximadamente -20°C
dilución de trabajo:	1:40000

5. Inmunización y producción de anticuerpos

5.1 Inmunización de conejos

Doce conejos chinchilla hembra, de 3 meses de edad, se inmunizaron con una emulsión de 100 µg de inmunógeno GL256, GL258 y GL262 en 0,5 ml de solución de NaCl al 0,9 % y 0,5 ml de adyuvante completo de Freund (CFA). En el mes siguiente se realizaron varias inmunizaciones de refuerzo. Para la tercera inmunización, se usaron 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (IFA). Cada inmunización se realizó en cuatro sitios subcutáneos y cuatro sitios intramusculares.

Grupo A – inmunógeno GL256

- Conejo 1 nº50
- Conejo 2 nº51
- Conejo 3 nº52
- Conejo 4 nº53

5

Grupo B – inmunógeno GL258

- Conejo 5 nº54
- Conejo 6 nº55
- Conejo 7 nº56
- Conejo 8 nº57

10

Grupo C – inmunógeno GL262

- Conejo 9 nº46
- Conejo 10 nº47
- Conejo 11 nº48
- Conejo 12 nº49

15

Esquema de inmunización

Día 1	Primera inmunización con 100 µg de inmunógeno/ml por animal en CFA
Día 29	Segunda inmunización con 100 µg de inmunógeno/ml por animal en CFA
Día 57	Tercera inmunización con 100 µg de inmunógeno/ml por animal en IFA el estado de salud del conejo podría cambiar a peor mediante el uso de inmunógenos GL256 y GL258 El conejo 7 nº56 no se trató
Día 67	Primera extracción de sangre (2 ml por animal)
Día 81	Cuarta inmunización con 100 µg de inmunógeno/ml por animal en CFA
Día 91	Segunda extracción de sangre (25 ml por animal)
Día 112	Quinta inmunización con 100 µg de inmunógeno/ml por animal en CFA
Día 122	Se perdió la asignación del número de animales Tercera extracción de sangre final (desangramiento)*

*Los Conejos nº 1-12 se desangraron completamente 10 días después de la quinta inmunización.

El desangramiento se realizó a través de una arteria carótida con anestesia con xilazina (Rompun[□], Bayer, Leverkusen, Germany) e hidrocloreuro de ketamina (Ketavet[®], Parke-Davis, Freiburg, Germany).

20 5.2 Análisis de suero de conejo

Se preparó suero por centrifugación de la sangre de conejo coagulada. Se obtuvo una fracción de proteína por precipitación con sulfato amónico y desalificación a través de una columna de Sephadex G25.

Las fracciones de proteína individuales de los sueros de conejo se exploraron con respecto al título de anti-dabigatrán mediante un procedimiento ELISA convencional.

25

ES 2 614 992 T3

Exploración-ELISA:

Etapa	Procedimiento
A	se adsorbieron fracciones de proteína de cada extracción de sangre durante una noche a temperatura ambiente en placas de microtitulación (100 µl/pocillo; 1, 2 o 4 µg/ml) en tampón 1. lavar las microplacas 4 veces, con 450 µl cada vez bloquear con 250 µl de tampón 3 durante al menos 1 hora
B	lavar las microplacas 4 veces, con 450 µl cada vez
C	añadir a cada pocillo de la placa de microtitulación, por triplicado: + 50 µl de tampón 2 + 50 µl de patrones de calibración en tampón 2 + 25 µl de conjugado de dabigatrán-peroxidasa de rábano picante (HRP) GL 261 (trazador) (1/40000)
D	sellar las microplacas con una lámina adhesiva, completar la distribución de muestra para todas las microplacas incubar durante 4 h en un agitador a temperatura ambiente
E	lavar las microplacas 4 veces, con 450 µl cada vez
F	añadir a cada pocillo de la placa de microtitulación 100 µl de o-fenilen diamina HCl, 2,7 mg/ml (un comprimido de 30 mg en 11 ml de tampón 4) incubar durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente
G	añadir a cada pocillo de la placa de microtitulación 100 µl de H ₂ SO ₄ (2,25 M) agitar durante 5 minutos
H	leer la absorbancia; longitud de onda de ensayo: 490 nm, longitud de onda de referencia: 650 nm

5.3 Detección de anticuerpos anti-dabigatrán en sueros de conejo

Tres últimas columnas: los valores son para dabigatrán

2ª extracción de sangre

conejo		inmunógeno	conc. de revestimiento [µg/ml]	conc. [Mol]	[Ext]	[%]
1	#50	GL256	2	0	1,812	100%
				2.E-12	1,574	87%
				2.E-11	0,461	25%
				2.E-10	0,059	3%
2	#51	GL256	1	0	2,193	100%
				2.E-12	2,086	95%
				2.E-11	1,515	69%

ES 2 614 992 T3

conejo		inmunógeno	conc. de revestimiento [µg/ml]	conc. [Mol]	[Ext]	[%]
				2.E-10	0,207	9%
3	#52	GL256	2	0	1,513	100%
				2.E-1.2	1,419	94%
				2.E-11	0,728	48%
				2.E-10	0,107	7%
4	#53	GL256	2	0	1,474	100%
				2.E-12	1,388	94%
				2.E-11	0,848	58%
				2.E-10	0,142	10%
5	#54	GL258	1	0	2,114	100%
				2.E-12	1,892	39%
				2.E-11	0,646	31%
				2.E-10	0,159	8%
6	#55	GL258	1	0	1,295	100%
				2.E-1.2	0,937	72%
				2.E-11	0,265	20%
				2.E-10	0,140	11%
7	#56	GL258	2	0	1,611	100%
				2.E-12	1,372	85%
				2.E-11	0,424	26%
				2.E-10	0,145	9%
8	#46	GL258	1	0	1,640	100%
				2.E-12	1,290	79%
				2.E-11	0,425	26%
				2.E-10	0,196	12%
9	#47	GL262	2	0	1,854	100%

ES 2 614 992 T3

conejo		inmunógeno	conc. de revestimiento [µg/ml]	conc. [Mol]	[Ext]	[%]
				2.E-12	1,534	83%
				2.E-11	0,530	29%
				2.E-10	0,254	-14%
10	#43	GL262	2	0	1,458	100%
				2.E-12	1,142	78%
				2.E-11	0,300	21%
				2.E-10	0,131	9%
11	#49	GL262	4	0	1,646	100%
				2.E-12	1,393	35%
				2.E-11	0,460	28%
				2.E-10	0,257	16%
12	#50	GL262	2	0	1,605	100%
				2.E-12	1,400	87%
				2.E-11	0,389	24%
				2.E-10	0,109	7%

Última extracción de sangre

conejo	inmunógeno	conc. de revestimiento [µg/ml]	conc. [Mol]	[Ext]	[%]
1	?	1	0	1,589	100%
			2.E-12	1,442	91%
			2.E-11	0,491	31%
			2.E-10	0,130	8%
2	?	1	0	1,375	100%
			2.E-12	1,041	78%
			2.E-11	0,293	21%
			2.E-10	0,101	7%
3	?	1	0	1,400	100%

ES 2 614 992 T3

conejo	inmunógeno	conc. de revestimiento [µg/ml]	conc. [Mol]	[Ext]	[%]
			2.E-12	1,081	77%
			2.E-11	0,288	21%
			2.E-10	0,097	7%
4	7	1	0	1,183	100%
			2.E-12	0,882	75%
			2.E-11	0,396	33%
			2.E-10	0,183	15%
5	?	1	0	1,335	100%
			2.E-12	1,066	80%
			2.E-11	0,183	14%
			2.E-10	0,057	4%
6	?	1	0	1,214	100%
			2.E-12	0,976	80%
			2.E-11	0,250	21%
			2.E-10	0,123	10%
7	?	2	0	1,822	100%
			2.E-12	1,702	33%
			2.E-11	0,661	36%
			2.E-10	0,189	10%
8	?	2	0	1,234	100%
			2.E-12	1,085	88%
			2.E-11	0,671	54%
			2.E-10	0,147	12%
9	?	1	0	1,911	100%
			2.E-12	1,862	97%
			2.E-11	0,980	51%

ES 2 614 992 T3

conejo	inmunógeno	conc. de revestimiento [µg/ml]	conc. [Mol]	[Ext]	[%]
			2.E-10	0,292	15%
10	?	1	0	1,933	100%
			2.E-12	1,891	98%
			2.E-11	1,055	55%
			2.E-10	0,076	4%
11	?	1	0	1,874	100%
			2.E-12	1,817	97%
			2.E-11	1,539	82%
			2.E-10	0,181	10%
12	?	2	0	1,599	100%
			2.E-12	1,425	39%
			2.E-11	0,475	30%
			2.E-10	0,050	3%

Después de la exploración de las fracciones de proteína de todos los conejos de la extracción de sangre 2, fue evidente que el conejo nº 5 (nº54) tenía el mayor título de anticuerpos anti-dabigatrán con el hepteno preferido HAPTENO2. Además, fue posible desplazar el trazador de los sitios de unión al anticuerpo con bajas concentraciones de analito (dabigatrán).

Para la exploración de la extracción de sangre 3 final, se usó el desplazamiento del trazador del sitio de unión al anticuerpo con bajas concentraciones de analito (dabigatrán) como criterio de decisión principal, porque faltaba información sobre el inmunógeno usado. Por lo tanto, los conejos nº 2, 3 y 5 se usaron para la purificación adicional.

5.4 Purificación de anticuerpos policlonales

El anti-suero del conejo nº 5 (nº54), extracción nº 2 y de los conejos nº 2, 3 y 5, extracción nº 3 (extracción final) se precipitó con sulfato amónico. El precipitado se centrifugó durante 30 min a 10°C a 4500 U/min, se separó de la solución y se volvió a disolver en tampón Tris. Este procedimiento se repitió. La purificación adicional se realizó por cromatografía de afinidad en proteína A sepharose FF. El tampón de la columna era Tris 0,01 M pH = 7,5 y se usó glicina 0,1 M pH = 3,0 para la elución. Se reunieron las fracciones que contenían la IgG de conejo. La concentración de proteínas se determinó por espectroscopía UV a 280 nm.

Resumen de especificaciones de anticuerpo:

inmunógeno:	HAPTENO2-BSA (lote nº GL258)
conejo:	nº 5 (nº54) suero (extracción nº 2)
contenido de proteína:	1,85 mg/ml
almacenamiento:	a aproximadamente -20°C

inmunógeno:	HAPTENO1-BSA (GL256) o HAPTENO2-BSA (lote nº GL258) o HAPTENO2-BSA (lote nº GL262)
conejo:	nº 2, suero recogido (extracción final)
contenido de proteína:	3,9 mg/ml
almacenamiento:	a aproximadamente -20°C

inmunógeno:	HAPTENO1-BSA (GL256) o HAPTENO2-BSA (lote nº GL258) o HAPTENO2-BSA (lote nº GL262)
conejo:	nº 3, suero (extracción final)
contenido de proteína:	9,96 mg/ml
almacenamiento:	a aproximadamente -20°C

inmunógeno:	HAPTENO1-BSA (GL256) o HAPTENO2-BSA (lote nº GL258) o HAPTENO2-BSA (lote nº GL262)
conejo:	nº 5, suero (extracción final)
contenido de proteína:	5,72 mg/ml
almacenamiento:	a aproximadamente -20°C

II. Neutralización de dabigatrán

- 5 Se realizaron dos series de experimentos para mostrar el efecto de los anticuerpos contra la actividad anticoagulante de dabigatrán *in vitro*. Los cuatro anticuerpos policlonales se recibieron en el laboratorio y se ensayaron adicionalmente en plasma humano. Esto se ensayó en el ensayo funcional, el tiempo de coagulación de trombina.

Descripción del ensayo:

- 10 En resumen, se obtiene plasma humano poniendo sangre entera en citrato sódico al 3,13%. Después se centrifuga para obtener plasma sin plaquetas y se transfiere a un tubo separado y se congela hasta que se necesita el día del ensayo. El plasma se descongela a 37°C el día del ensayo.

- 15 El tiempo de coagulación de trombina se realiza como se indica a continuación. Primero se diluye trombina hasta la especificación del fabricante (3 UI/ml de trombina) en el tampón proporcionado (kit de ensayo Dade Behring) y se precalienta a 37°C. Se usa en las 2 h siguientes a su preparación. Todos los ensayos se realizaron en una máquina de coagulación CL4 disponible en el mercado (Behnk Electronics, Norderstadt, Germany). Se pipetea cincuenta µl de plasma en cubetas proporcionadas con un agitador magnético y se dejan en agitación durante 2 min en el pocillo precalentado a 37°C en la máquina CL4. En este momento, se añaden 100 µl de la solución de trombina y se registra automáticamente el tiempo requerido para que la muestra de plasma coagule por el CL4. Se preincuba dabigatrán durante 5 min en plasma en las cubetas proporcionadas, antes de añadir trombina y empezar la medición. Si también se ensaya anticuerpo (hasta 50 µl de solución madre), hay una incubación adicional de 5 minutos a 37°C antes de empezar la coagulación (es decir, incubación total de 10 min con dabigatrán, incubación total de 5 min con anticuerpo y después se inicia la coagulación con trombina).

- 25 Inicialmente se realizó una curva patrón de dabigatrán añadiendo concentraciones crecientes de dabigatrán a plasma humano y midiendo el tiempo hasta la coagulación después de la adición de trombina (Figura 1). Hubo un aumento dependiente de la concentración en el tiempo de coagulación de trombina con concentraciones crecientes de dabigatrán.

- 30 Para la primera serie de experimentos de neutralización, se añadió una concentración clínicamente relevante de 200 nM de dabigatrán a todas las muestras de plasma para la neutralización. Las 4 preparaciones de anticuerpo pudieron acortar el tiempo para la coagulación en plasma que contenía dabigatrán (Figura 2). El grado de neutralización estaba relacionado con la concentración de proteína en cada preparación de anticuerpo. La solución

de anticuerpo con la mayor concentración (D) después se diluyó en serie y se ensayó con respecto a la capacidad de neutralizar la actividad anticoagulante de dabigatrán 200 nM en una serie separada de experimentos. En la Figura 3 puede verse que había una inhibición dependiente de la concentración de la actividad anticoagulante inducida por dabigatrán con concentraciones crecientes de anticuerpo. Además, cuando se añadió un anticuerpo policlonal de conejo no específico (cuadrado azul) a plasma que contenía dabigatrán, no tuvo capacidad de neutralizar la actividad anticoagulante. La dependencia de la concentración y la ausencia de neutralización de un anticuerpo no específico indican que la inversión de la anticoagulación por el anticuerpo es específica para el dabigatrán.

Sin embargo, estas concentraciones de dabigatrán son clínicamente relevantes, y probablemente se producirán hemorragias o sobredosis con concentraciones superiores. Por lo tanto, también se ensayó la capacidad de un anticuerpo de inhibir la actividad anticoagulante de la mayor concentración de dabigatrán (500 nM) en la curva patrón de la Figura 1. La Figura 4 ilustra que el anticuerpo D también podía inhibir altas concentraciones de dabigatrán.

l. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-dabigatrán

1. Producción de anticuerpos monoclonales anti-dabigatrán y fab

Se inmunizaron ratones con Hapteno1 (véase el Ejemplo 1.1) conjugado con proteínas de soporte tales como hemocianina e inmunoglobulina y se generaron hibridomas de acuerdo con procedimientos convencionales. Los anticuerpos monoclonales purificados a partir de los sobrenadantes de cultivo se unieron a conjugados de dabigatrán-proteína y esta unión pudo competir con dabigatrán en solución con una inhibición semimáxima a concentraciones en el intervalo de 1 a 10 nM. Se generaron Fab por escisión con papaína de los anticuerpos monoclonales con la posterior eliminación del dominio Fc a través de la Proteína A.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de ratón se clonaron y secuenciaron usando métodos convencionales. Las secuencias se confirmaron por análisis de proteínas por espectrometría de masas y secuenciación N-terminal de los anticuerpos. Se generaron construcciones de ADN que codificaban anticuerpos quiméricos que comprendían las regiones variables de ratón específicas y regiones constantes de IgG humana y la proteína se expresó en células HEK 293T y se purificó.

2. Caracterización de Fab y anticuerpo monoclonal anti-dabigatrán

Las secuencias de los dominios variables de tres clones de anticuerpo monoclonal se representan en las Figuras 5 y 6. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables del clon 13 se representan en la Figura 5 (DBG 13 VH, cadena pesada, SEQ ID NO: 16) y Figura 6 (DBG 13 VK, cadena ligera, SEQ ID NO: 17). Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables del clon 14 están representadas en la Figura 5 (DBG 14 VH, cadena pesada, SEQ ID NO: 18) y la Figura 6 (DBG 14 VK, cadena ligera, SEQ ID NO: 19). Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables del clon 22 se representan en la Figura 5 (DBG 22 VH, cadena pesada, SEQ ID NO: 20) y la Figura 6 (DBG 22 VK, cadena ligera, SEQ ID NO: 21).

El clon 22 de anticuerpo monoclonal de ratón se ensayó con respecto a su capacidad de neutralizar la actividad anticoagulante de dabigatrán en plasma humano en el ensayo de tiempo de coagulación de trombina expuesto en el Ejemplo II. El anticuerpo invirtió completamente la prolongación mediada por dabigatrán de la coagulación dependiente de trombina en plasma humano de una manera dependiente de la dosis (Figura 7). El anticuerpo también inhibía eficazmente la función del dabigatrán en sangre entera humana. Un Fab generado a partir de este anticuerpo bloqueaba la actividad del dabigatrán en plasma humano, lo que demuestra que los dominios de unión al antígeno monovalentes pueden neutralizar la actividad anticoagulante del compuesto. (Figura 8).

La ruta metabólica principal de dabigatrán en seres humanos es mediante la glucuronidación del resto carboxilato. Se ha demostrado que los acilglucuronidos de dabigatrán son farmacológicamente activos (Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75). Para ensayar si el clon 22 de anticuerpo monoclonal de ratón podía neutralizar estos metabolitos, se purificaron acilglucuronidos de dabigatrán a partir de la orina de monos rhesus tratados con dabigatrán y evaluados en el ensayo del tiempo de coagulación de trombina. La dosis de anticuerpo invirtió de una manera dependiente de la dosis la prolongación mediada por acilglucuronido de dabigatrán de la coagulación dependiente de trombina en plasma humano con una potencia similar a la observada con dabigatrán (Figura 9). De esta manera, el anticuerpo es eficaz para bloquear la actividad anticoagulante de metabolitos de dabigatrán encontrados en seres humanos.

Las afinidades del Fab y los anticuerpos quiméricos de ratón-humano que comprenden los dominios variables de los clones 22, 13 y 14 y regiones constantes de inmunoglobulina humana (región constante de cadena ligera: SEQ ID NO: 44; región constante de cadena pesada: SEQ ID NO: 45) se determinaron usando la tecnología Kinexa. Una concentración constante de Fab o anticuerpo quimérico se incubó con diversas concentraciones de dabigatrán hasta que se alcanzó el equilibrio. Después de esta incubación, se determinó la concentración de anticuerpo libre mediante la captura del anticuerpo en perlas de Neutravidina acopladas con análogo de dabigatrán conjugado con Biotina. El Fab capturado se detectó con un fragmento F(ab')₂ (específico de Fab) de IgG anti-ratón marcado con FITC. Los anticuerpos quiméricos capturados se detectaron con una IgG anti-humana conjugada con Cy5. Las

constantes de disociación se calcularon usando un modelo de unión 1:1. Los resultados de estos experimentos se resumen en la siguiente tabla.

Afinidad de anticuerpos anti-dabigatrán

Anticuerpo	K _d Aparente
Clon 22 Fab	48 pM
Clon 22 Ab Quimérico	34 pM
Clon 13 Ab Quimérico	60 pM
Clon 14 Ab Quimérico	46 pM

5 Tanto el Fab como los anticuerpos quiméricos se unen al dabigatrán con alta afinidad.

3. Generación de Fab y anticuerpos monoclonales anti-dabigatrán humanizados

Para reducir la inmunogenicidad potencial después de la administración en un ser humano, los anticuerpos monoclonales de ratón se 'humanizaron.' Se seleccionaron secuencias flanqueantes humanas para los ejemplos de ratón basándose en la homología estructural, estructura de CDR, restos canónicos conservados, restos de empaquetamiento de interfaz conservados y otros parámetros. La sustitución específica de restos aminoacídicos en estas posiciones flanqueantes puede mejorar varios aspectos del comportamiento del anticuerpo, incluyendo la afinidad de unión y/o estabilidad, con respecto a lo demostrado en anticuerpos humanizados formados por "cambio directo" de CDR o HVL en regiones flanqueantes de línea germinal humana. Los Fab que mostraron una unión mejor o igual y mejor expresión en comparación con el Fab parental quimérico se seleccionaron para una caracterización adicional. Las secuencias de aminoácidos para los dominios variables de los Fab humanizados se representan en la Figura 5 (Eng VH 14, SEQ ID NO:22; ENG VH15, SEQ ID NO: 24; y ENG VH 31, SEQ ID NO: 26) y en la Figura 6 (Eng VK 11, SEQ ID NO: 23; ENG VK 17, SEQ ID NO: 25; y ENG VK 18, SEQ ID NO: 27). Un Fab que comprendía Eng VH 15 y Eng Vh 18 (cadena ligera: SEQ ID NO: 37; cadena pesada: SEQ ID NO: 36) se expresó directamente en células CHO y se purificó usando resinas de Kappa select y Proteína G.

20 El Fab que comprendía Eng VH15 y Eng VK 18 también se convirtió en una IgG de longitud completa en el formato IgG1KO (cadena ligera: SEQ ID NO: 35; cadena pesada: SEQ ID NO: 40). IgG1 KO (con funciones efectoras suprimidas) tiene dos mutaciones en la región Fc, Leu234Ala y Leu235Ala, que reducen la función efectora, tal como FcgR y la unión al complemento. El formato de IgG se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Hezareh et al. (2001) Journal of Virology 75: 12161-12168). Los anticuerpos anti-dabigatrán humanizados opcionalmente incluyen sustituciones de aminoácidos específicas en las regiones consenso o flanqueantes de línea germinal. El anticuerpo 18/15 se expresó en células HEK 293T y se purificó. Se generaron fragmentos Fab por escisión por Lys-C del anticuerpo intacto y se purificaron con eliminación del dominio Fc a través de la Proteína A.

4. Caracterización de Fab anti-dabigatrán

30 El fragmento Fab 18/15 generado por escisión de Lys-C del anticuerpo intacto se ensayó con respecto a su capacidad de neutralizar la actividad anticoagulante de dabigatrán en plasma humano en el ensayo de tiempo de coagulación de trombina expuesto en el Ejemplo II. El Fab invirtió completamente la prolongación mediada por dabigatrán de la coagulación dependiente de trombina en plasma humano de una manera dependiente de la dosis con una CI50 de 2,6 nM (Figura 10). El fragmento Fab directamente expresado y el fragmento Fab generado por escisión con papaína del anticuerpo intacto también neutralizó la actividad anticoagulante de dabigatrán con CI50 de 2,6 y 2,7 nM respectivamente.

La afinidad del Fab 18/15 generada por escisión de Lys-C del anticuerpo intacto y del Fab directamente expresado se determinó en un instrumento BIAcore utilizando la tecnología SPR. Los Fab se preincubaron con concentraciones crecientes de dabigatrán durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se dejó fluir sobre una microplaca de detección recubierta con análogo de dabigatrán conjugado con biotina inmovilizado y se controló la unión de Fab libre. Usando este diseño de ensayo de competición en solución, se determinó que los valores de Kd de los Fabs para dabigatrán eran de 0,16 pM para el Lys-C generado y 0,45 pM para los Fabs directamente expresados

45 Experimentos in vivo con Fab generado por escisión con papaína Las ratas (Wistar macho, 300 g) se anestesiaron con pentobarbital en forma de bolo (60 mg/kg ip) y una infusión continua para anestesia de mantenimiento (20 mg/kg/hr ip) y se colocaron en una almohadilla de calentamiento a 37°C para mantener la temperatura corporal interna. La arteria carótida fue aislada y canulada para tomar muestras de sangre y la vena yugular derecha para la administración de la sustancia. Dabigatrán se inició como un bolo (0,3 μ M/kg) y seguido de una infusión (0,1 μM/kg/h) durante 20 minutos para lograr niveles estables en el plasma. Después de 20 min, el Fab se inyectó i.v.

como un solo bolo a concentraciones equimolares o equimolares a través de la vena yugular izquierda. Se toman muestras de sangre (dilución 1/10 en citrato de sodio al 3,13%) en la línea de base (-20, -2 min) y a intervalos variables durante 30 minutos después de la inyección de Fab.

5 Los efectos anticoagulantes del dabigatran se midieron como tiempos de coagulación de sangre total, incluyendo el tiempo de trombina (TT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Brevemente, el tiempo de trombina se realiza en un coagulómetro añadiendo 50 µl de sangre entera a un pocillo que está precalentado a 37°C. Se añade trombina (Siemens Healthcare, Marburg, Alemania) en concentraciones de 3,0 U/ml (100 µl de volumen) y se mide el tiempo necesario para coagular la muestra. El aPTT de sangre entera se realiza calentando 50 µL de sangre entera a 37°C en un coagulómetro y añadiendo 50 µl de reactivo de aPTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) durante 3 minutos. El tiempo de coagulación se inicia por la adición de 50 µl de cloruro de calcio precalentado (37°C) 0,025 M . Después se registra el tiempo requerido para coagular la muestra de sangre entera.

10 Los resultados de Fab 18/15 (cadena ligera: SEQ ID NO: 37, fragmento Fd de cadena pesada: SEQ ID NO: 41, producidos por escisión con papaína de inmunoglobulina completa expresada en células CHO) dado como una única inyección i.v.a una dosis equimolar a dabigatran se muestran en las Figuras 11 y 12. Hubo una inhibición rápida y casi inmediata de la actividad anticoagulante de dabigatran, medida tanto como TT (Figura 11) y como TTPA (Figura 12) en este modelo. Un minuto después de la inyección, la actividad anticoagulante con dabigatran se neutralizó completamente hasta los niveles basales. Esto se mantuvo durante más de 20 min, a pesar de la continua infusión en curso de dabigatran i.v..

20 When the lower dose, half the molar dose of dabigatran was given, there was also an initial reduction of both TT (Figure 13) and the aPTT (Figure 14). Cuando se administró la dosis más baja, la mitad de la dosis molar de dabigatran, también hubo una reducción inicial tanto del TT (Figura 13) como del aPTT (Figura 14). Sin embargo, esto no se mantuvo mientras la dosis más alta bajo las condiciones de la infusión continua en marcha de dabigatran.

25 Por lo tanto, estos resultados demuestran una neutralización predecible, dependiente de la dosis y muy rápida de la actividad anticoagulante de dabigatran después de una única administración i.v.de Fab anti-dabigatran en este modelo animal.

ES 2 614 992 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> VH CDR2 C

<400> 5

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser
 10 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> VH CDR2 D

<400> 6

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser
 20 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> VH CDR2 E

<400> 7

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser
 30 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> VH CDR2 F

<400> 8

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser
 40 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> VH CDR3 A

<400> 9

Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Ala Tyr
 50 1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT

55 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT

ES 2 614 992 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH CDR3 B

5 <400> 10

Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

10 <210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> VK CDR1 A

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
20 1 5 10 15

<210> 12
<211> 16
<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VK CDR1 B

30 <400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> VK CDR1 C

<400> 13

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
45 1 5 10 15

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> VK CDR2

<400> 14

55 **Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser**
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60

ES 2 614 992 T3

<220>

<223> VK CDR3

<400> 15

5

Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 16

<211> 122

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Val Gln Leu Lys Gln 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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

15

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

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

20

<213> Mus musculus

<400> 17

ES 2 614 992 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

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

Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

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

10 Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

15 <210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 19

ES 2 614 992 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 20
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

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

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

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

10 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

15 <210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

ES 2 614 992 T3

<400> 21

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

- 5 <210> 22
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de anticuerpos diseñada, dominio variable de cadena pesada ENG VH 14

<400> 22

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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys 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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 23

ES 2 614 992 T3

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpos diseñada, dominio variable de cadena pesada ENG VK 11

<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

10 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 24
 <211> 122
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Secuencia de anticuerpos diseñada, dominio variable de cadena pesada ENG VH 15

<400> 24

ES 2 614 992 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys 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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 25
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de anticuerpos diseñada, dominio variable de cadena pesada, ENG VK 17

<400> 25

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 26
<211> 122
<212> PRT

ES 2 614 992 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpos diseñada, dominio variable de cadena pesada ENG VH 31

5

<400> 26

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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

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

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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

10

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Secuencia de anticuerpos diseñada, dominio variable de cadena pesada, ENG VK 18

<400> 27

ES 2 614 992 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Conector
 <400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

15 <210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Conector
 <400> 29

25 Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
 1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly
 20 25

30 <210> 30
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Conector
 <400> 30

ES 2 614 992 T3

Ser Pro Asn Gly Ala Ser His Ser Ser Ser Ala Ser Gln Thr Gly Ser
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Ser Gln
 20

5 <210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Conector

<400> 31

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly

15 <210> 32
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo diseñada, scFv

<400> 32

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

Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30

25 Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly
 35 40 45

ES 2 614 992 T3

Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly
50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu
85 90 95

Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
130 135 140

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser
145 150 155 160

Tyr Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu
180 185 190

Arg Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
195 200 205

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 33

<211> 251

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo diseñada, scFv2

10

<400> 33

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

ES 2 614 992 T3

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala
 50 55 60

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

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

Cys Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr
 130 135 140

Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
 145 150 155 160

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr
 165 170 175

Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
 180 185 190

Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245 250

<210> 34

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Cadena pesada de IgG1

10

<400> 34

ES 2 614 992 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60

Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys 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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

ES 2 614 992 T3

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 35

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Cadena ligera de IgG1

10

<400> 35

ES 2 614 992 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 36
 <211> 225
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Fd de Fab

10 <400> 36

ES 2 614 992 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60

Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys 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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys
 225

<210> 37

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Cadena ligera de Fab

10

<400> 37

ES 2 614 992 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 38

<211> 226

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Fd de Fab

10

<400> 38

ES 2 614 992 T3

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

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser
 20 25 30

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

Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu
 50 55 60

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

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

Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys
 225

5 <210> 39
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Cadena ligera de Fab

<400> 39

ES 2 614 992 T3

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

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30

Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln
 85 90 95

Ser Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

5 <210> 40
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Cadena pesada de IgG1

<400> 40

ES 2 614 992 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60
 Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys 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
 Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

ES 2 614 992 T3

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 41
<211> 229
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de anticuerpo diseñada, Fd de Fab

10 <400> 41

ES 2 614 992 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60

Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys 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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His
 225

5 <210> 42
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada de IgG quimérica de ratón/humana

<400> 42

ES 2 614 992 T3

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

ES 2 614 992 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

5 <210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

10 <400> 44

ES 2 614 992 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 45
<211> 330
5 <212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

10 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

ES 2 614 992 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad de unión para dabigatrán que comprende un dominio variable de cadena pesada con una CDR1 de SEQ ID NO: 1, una CDR2 de SEQ ID NO: 7, una CDR3 de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera con una CDR1 de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de SEQ ID NO: 14, y una CDR3 de SEQ ID NO: 15.
2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 24, y un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 27.
- 10 3. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de un anticuerpo, en particular un Fab, Fab 'o F (ab') 2, un anticuerpo de cadena única, en particular un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), un inmunofármaco modular pequeño (SMIP) o un diacuerpo.
4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 3, que es un scFv, en el que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera están conectados entre sí a través de un péptido conector seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, y SEQ ID NO: 31.
- 15 5. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 3 que tiene una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35.
6. El anticuerpo de la reivindicación 3, que es una molécula de Fab que tiene un fragmento Fd que comprende SEQ ID NO: 36, o SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37.
- 20 7. El anticuerpo de la reivindicación 6 que tiene un fragmento Fd que comprende SEQ ID NO: 36, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37.
8. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso como medicamento.
9. Molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como antídoto de la terapia con dabigatrán o dabigatrán etexilato, y / o para la inversión de una sobredosificación de dabigatrán o dabigatrán etexilato.
- 25 10. Método de fabricación de una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende
- (a) proporcionar una célula huésped que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican dicha molécula de anticuerpo en asociación funcional con una secuencia de control de expresión,
- (b) cultivar dicha célula huésped, y
- 30 (c) recuperar la molécula de anticuerpo del cultivo celular.
11. Un kit que comprende:
- (a) un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una composición farmacéutica del mismo;
- (b) una composición farmacéutica de dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 35 (c) un recipiente; y
- (d) una etiqueta.
12. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la sal farmacéuticamente aceptable de dabigatran etexilato es una sal mesilato.
- 40 13. El kit de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que la resistencia por unidad de dosificación del dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo está entre 75 mg y 300 mg, o bien una vez al día (QD) O dos veces al día (BID).
14. Un kit que comprende:
- (a) una primera composición farmacéutica que comprende dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 45 (b) una segunda composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;

- (c) instrucciones para la administración separada de dichas primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente,
- 5 en donde dicha primera y segunda composiciones farmacéuticas están contenidas en recipientes separados y dicha segunda composición farmacéutica es para su uso en administración a un paciente que requiere neutralización o neutralización parcial de dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán.
15. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método para neutralizar o neutralizar parcialmente dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán en un paciente que se trata con dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 16. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método para neutralizar o neutralizar parcialmente dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatran en un paciente que comprende:
- (a) confirmar que un paciente estaba siendo tratado con dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la cantidad que fue tomada por el paciente;
- (b) neutralizar dabigatrán o 1-O-acilglucurónido con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 antes de realizar una prueba o ensayo de coagulación en el que dabigatrán o el 1-O-acilglucurónido de dabigatrán interferiría con la lectura precisa de los resultados de la prueba o del ensayo;
- 15 (C) realizar el ensayo de coagulación en una muestra tomada del paciente para determinar el nivel de formación de coágulos sin dabigatrán o 1-0-acilglucurónido de dabigatrán presente; y
- (D) ajustar una cantidad de dabigatrán, dabigatrán etexilato, un profármaco de dabigatrán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo administrada al paciente con el fin de lograr el equilibrio apropiado entre la formación de coágulos y la degradación en un paciente.
- 20 17. El anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 15 ó 16, en el que la cantidad de anticuerpo contra dabigatrán o 1-0-acilglucurónido de dabigatrán está en la relación molar de entre 0,1 y 100.
18. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la cantidad de anticuerpo contra dabigatrán o 1-O-acilglucurónido de dabigatrán está en la relación molar de entre 0,1 y 10.
- 25 19. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la lectura precisa del resultado de la prueba o ensayo es una lectura precisa de los niveles de fibrinógeno, resistencia a proteína C activada o pruebas relacionadas.
20. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

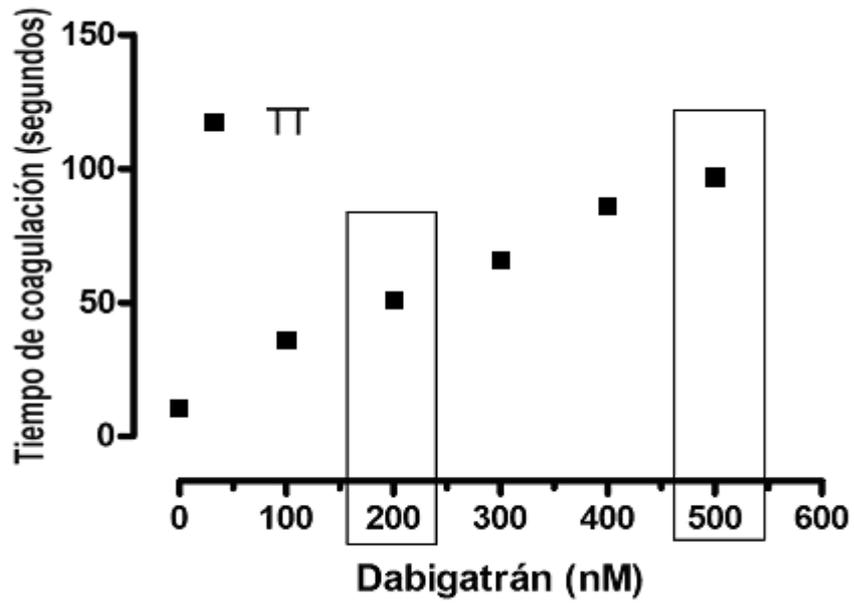


Figura 1

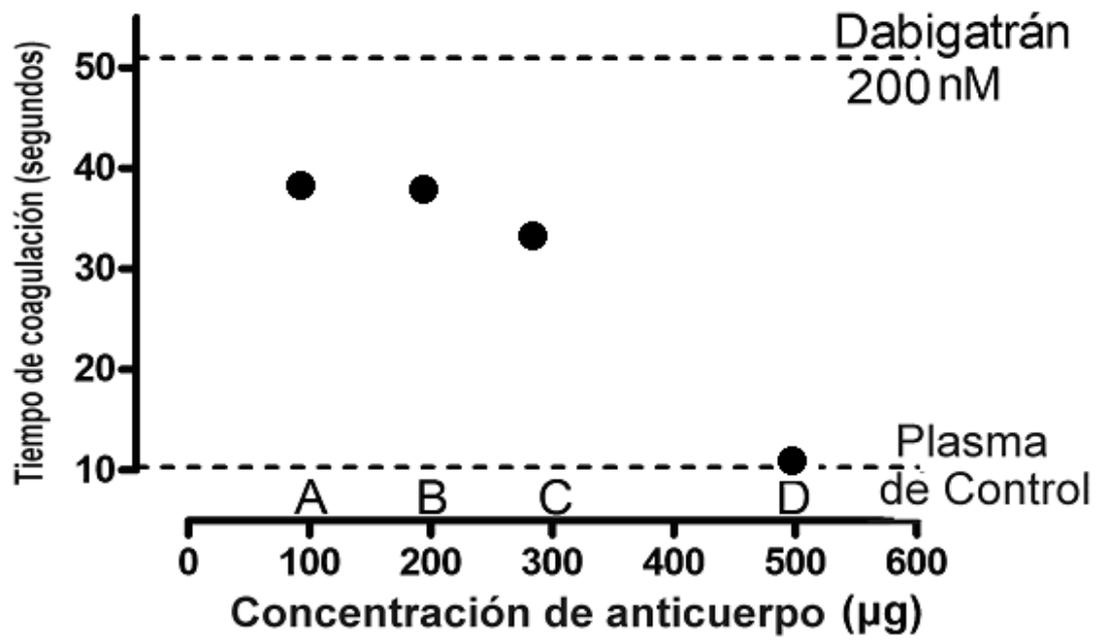


Figura 2

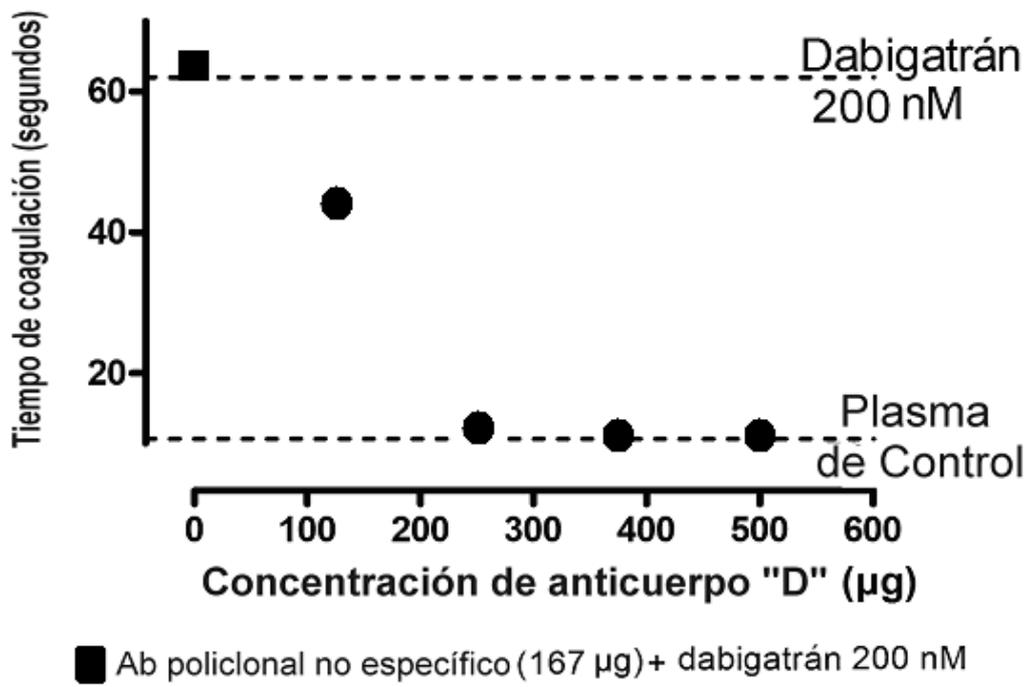


Figura 3

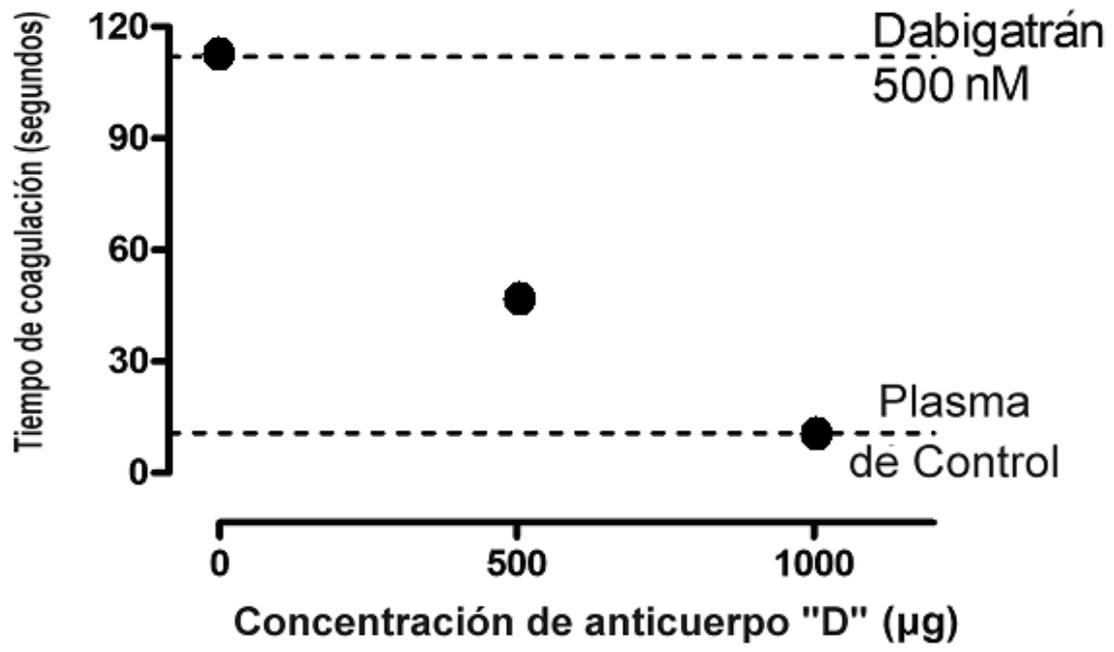


FIGURA 4

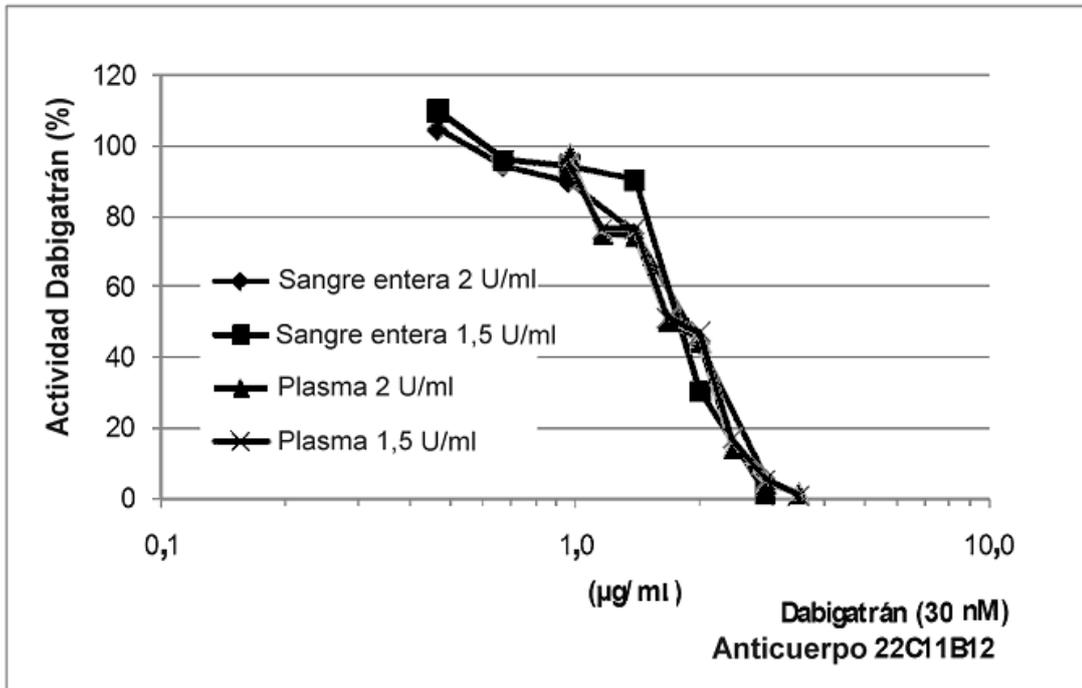


FIGURA 7

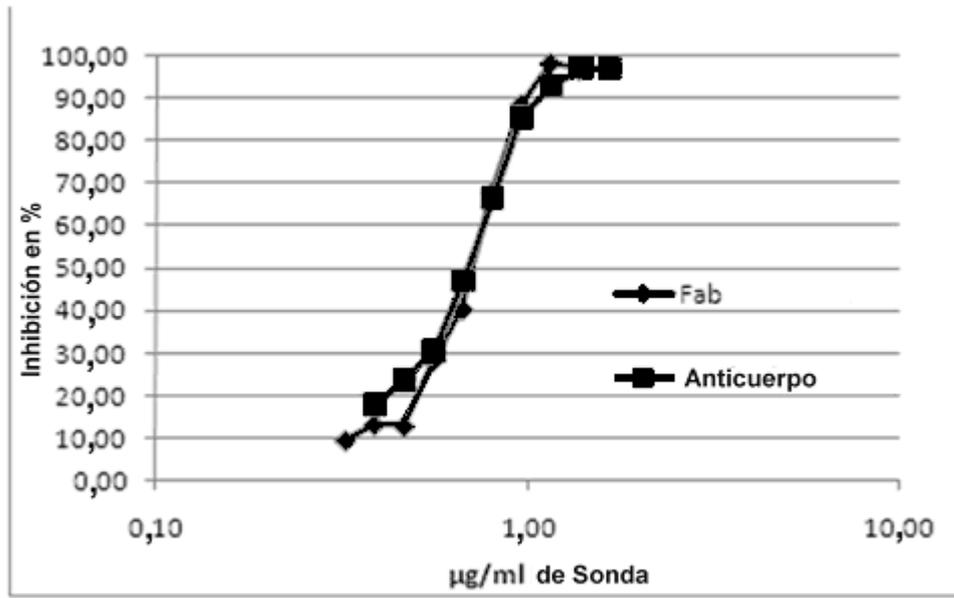


FIGURA 8

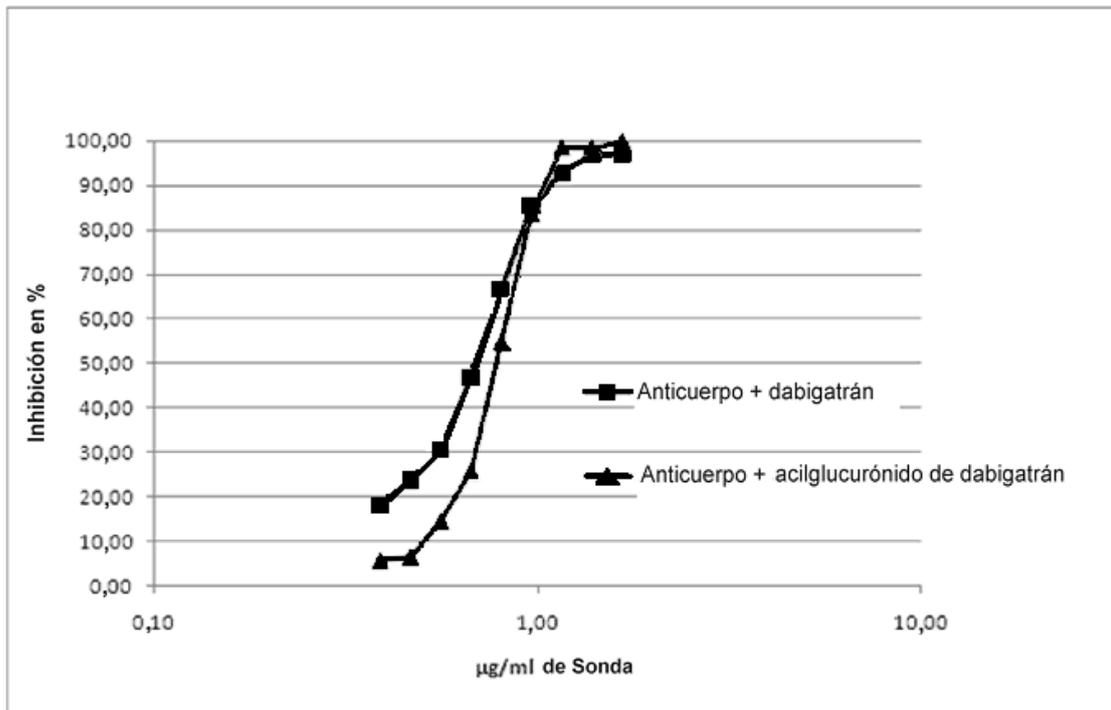


FIGURA 9

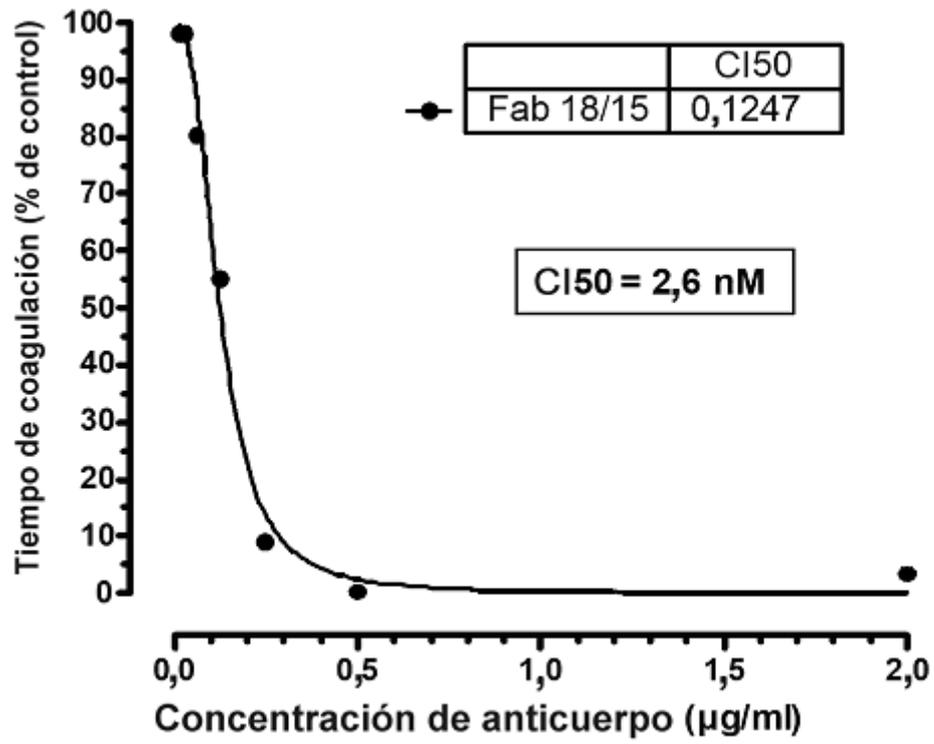
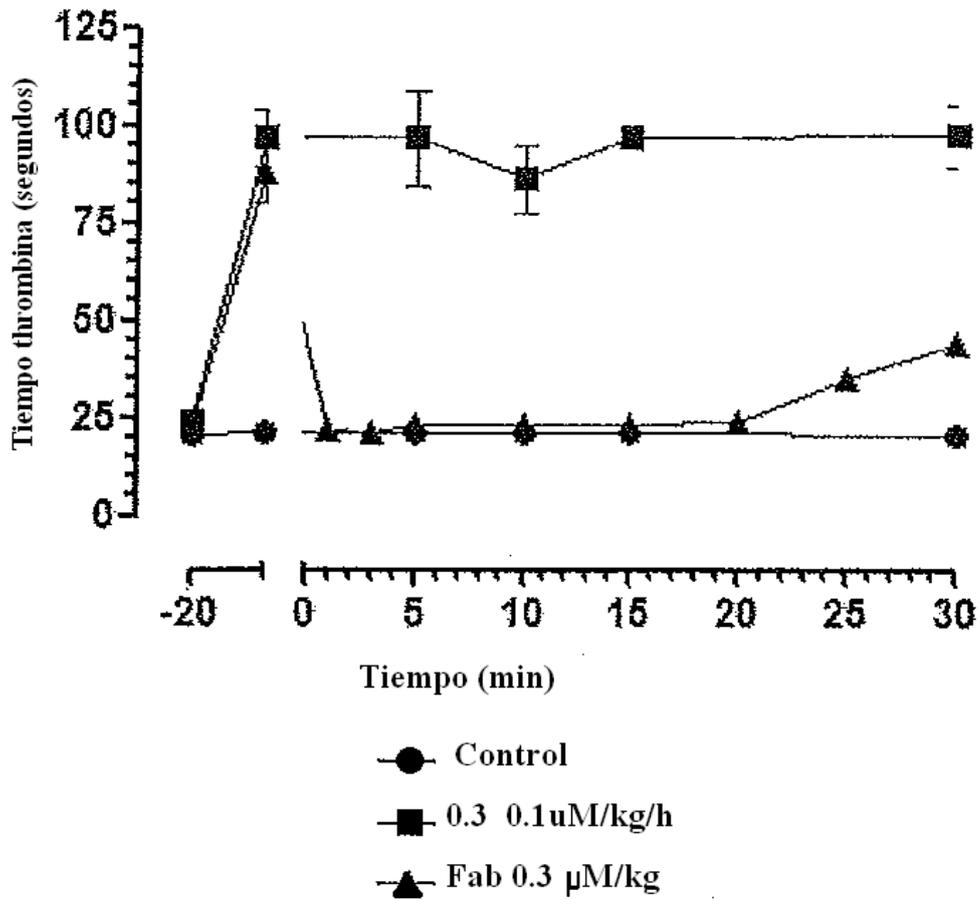
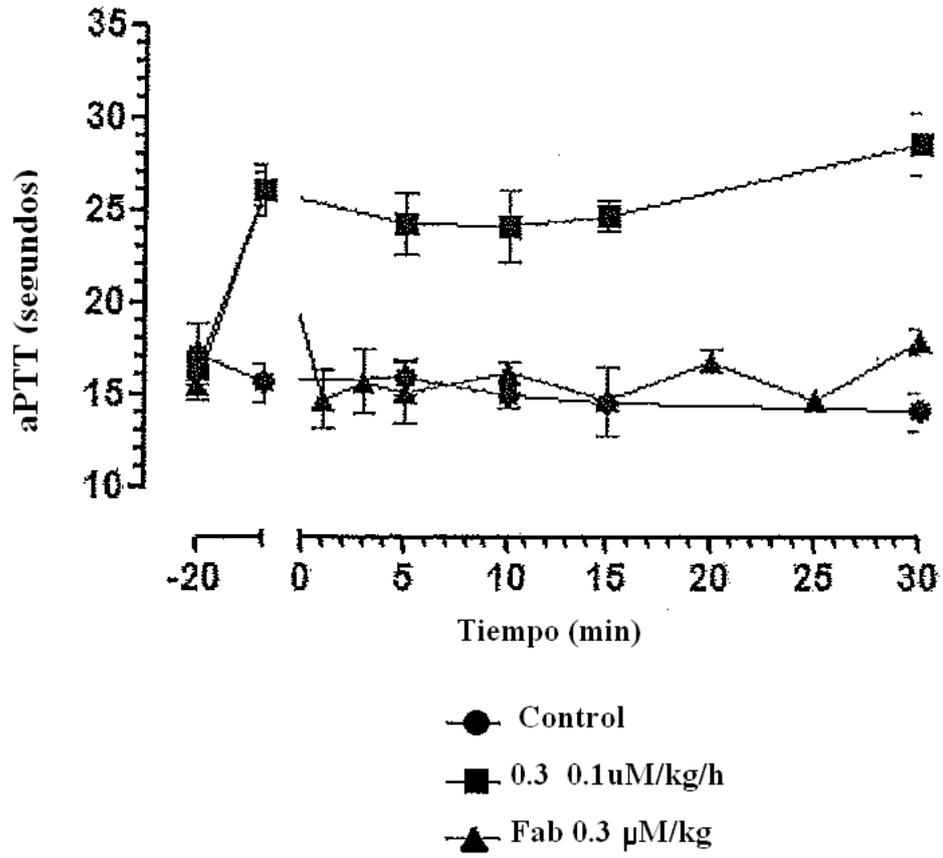


Figura 10



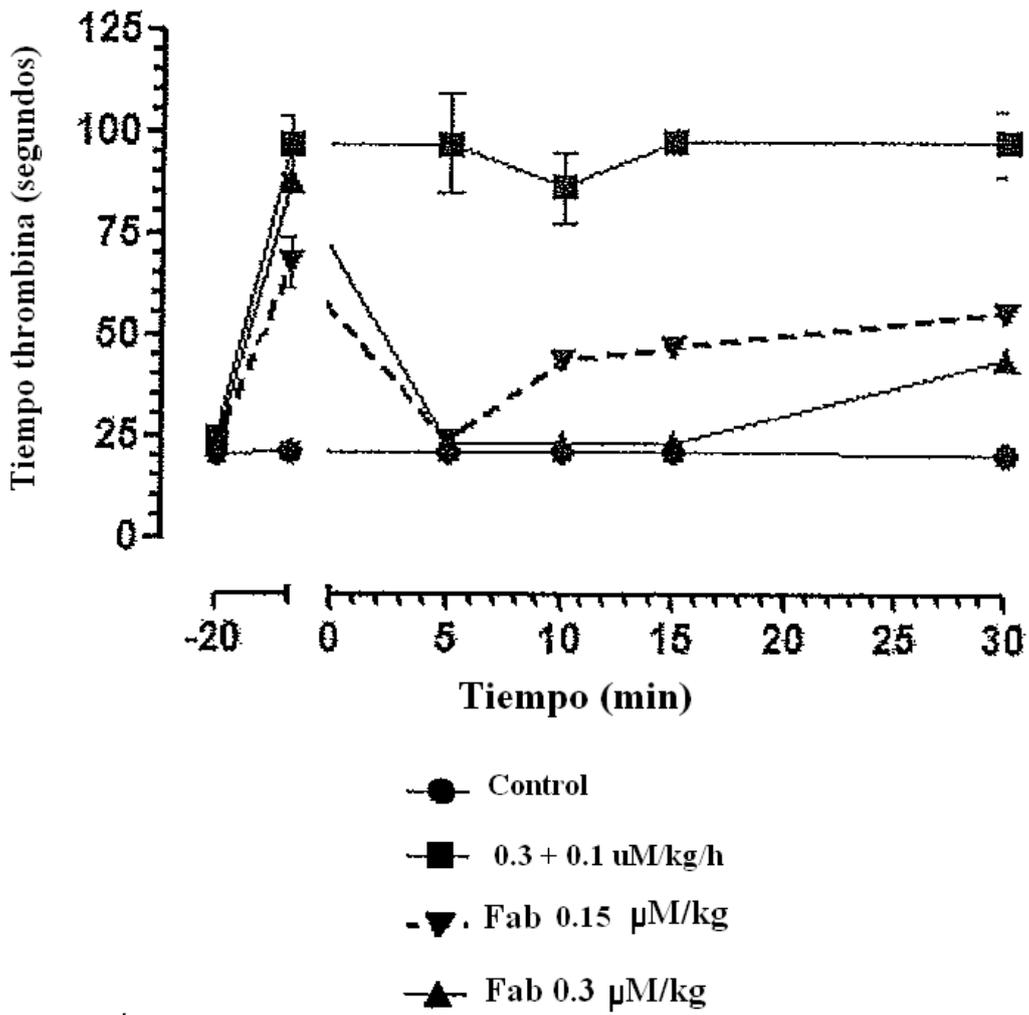
Dabigatran: bolo (0.3 μM/KG) + infusión (0.1 μM/kg/h)
 Tiempo thrombina: 3.0 U/ml thrombina utilizado en el ensayo
 Data expresado como media ± ET n=4

Figura 11



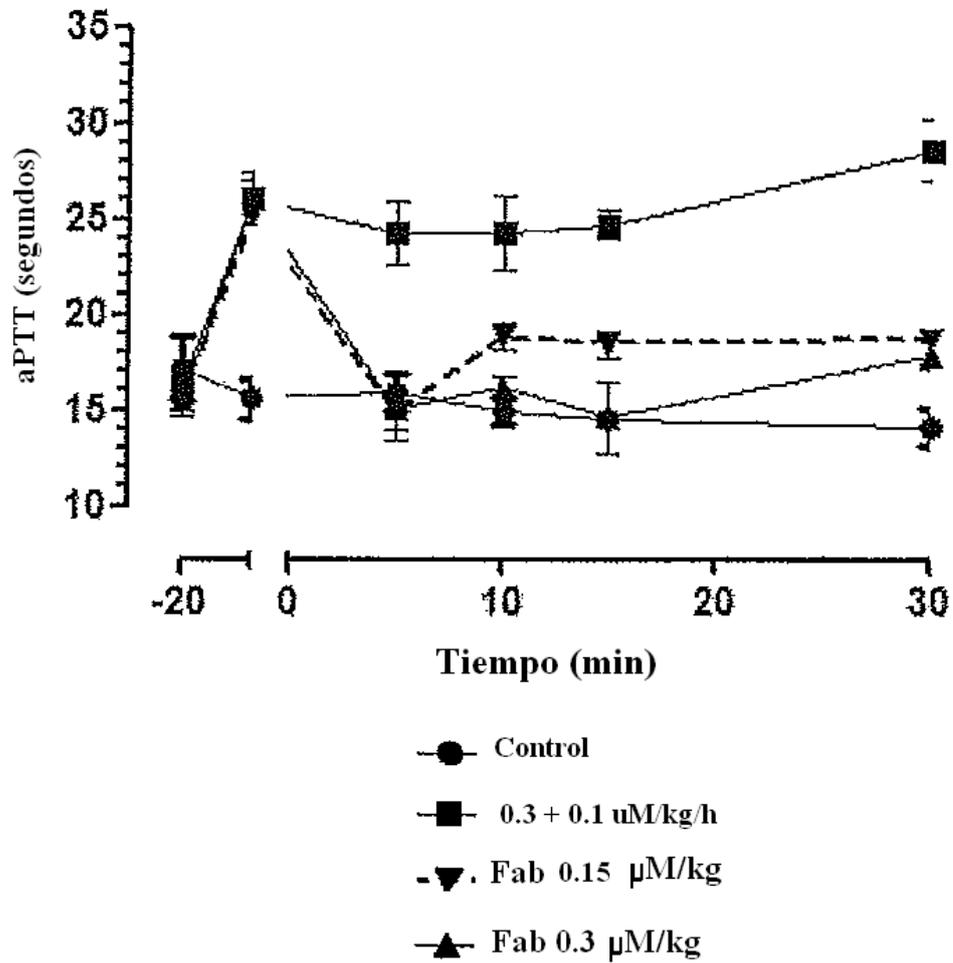
Dabigatran: bolo (0.3 μM/KG) + infusión (0.1 μM/kg/h)
 Data expresado como media ± ET, n=4

Figura 12



Dabigatran: bolo (0.3 µM/KG) + infusión (0.1 µM/kg/h)
 Tiempo thrombina: 3.0 U/ml thrombina utilizado en el ensayo
 Data expresado como media ± ET n=4

Figura 13



Dabigatran: bolo (0.3 µM/KG) + infusión (0.1 µM/kg/h)
 Data expresado como media ± ET n=4

Figura 14