(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 755 449**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2016 PCT/EP2016/054650**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16142289**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2016 E 16708978 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3265489**

(54) Título: **Compuestos para aumentar la semi-vida del factor von Willebrand**

(30) Prioridad:

06.03.2015 EP 15158088

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2020

(73) Titular/es:

CSL BEHRING LENGNAU AG (100.0%)
Industriestrasse 11
2543 Lengnau BE, CH

(72) Inventor/es:

MOSES, MICHAEL;
SCHULTE, STEFAN;
DICKNEITE, GERHARD;
KALINA, UWE y
PESTEL, SABINE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Compuestos para aumentar la semi-vida del factor von Willebrand.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a productos y métodos para mejorar el tratamiento de los trastornos de coagulación de la sangre.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Existen diversos trastornos hemorrágicos causados por deficiencias de factores de coagulación de la sangre. Los trastornos más comunes son hemofilia A y B, resultantes de deficiencias de los factores VIII (FVIII) y IX de coagulación de la sangre, respectivamente. Otro trastorno hemorrágico conocido es la enfermedad de von Willebrand (VWD).

En el plasma, FVIII existe principalmente como un complejo no covalente con factor von Willebrand (VWF), y su función coagulante es acelerar la conversión del Factor X en Xa dependiente del factor IXa.

La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. La misma es resultado de una deficiencia del factor de coagulación FVIII ligada al cromosoma X, que afecta casi exclusivamente a los varones con una incidencia comprendida entre 1 y 2 individuos por cada 10. 000. El defecto del cromosoma X se trasmite por portadores hembra que no son hemofílicos en sí mismos. La manifestación clínica de la hemofilia A es una tendencia aumentada a sufrir hemorragias.

En la hemofilia A grave, tiene que administrarse FVIII por vía intravenosa (i. v.) a los pacientes sometidos a tratamiento profiláctico aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta semi-vida en plasma de FVIII, de aproximadamente 12 a 14 horas. Cada administración i. v. es molesta, está asociada con dolor e implica especialmente riesgo de infección, dado que en la mayoría de los casos es realizada en el domicilio por los propios pacientes o por los padres de los niños diagnosticados de hemofilia A.

Por tanto, sería sumamente deseable aumentar la semi-vida de FVIII a fin de que las composiciones farmacéuticas que contienen FVIII tengan que administrarse con menor frecuencia.

Se han realizado varios intentos para prolongar la semi-vida de FVIII no activado por reducción de su interacción con receptores celulares (WO 03/093313 A2, WO 02/060951A2), por unión covalente de polímeros a FVIII (WO 94/15625, WO 97/11957 y US 4970300), por encapsulación de FVIII (WO 99/55306), por introducción de nuevos sitios de fijación de metal (WO 97/03193), por unión covalente del dominio A2 al dominio A3 sea por unión peptídica (WO 97/40145 y WO 03/087355) o unión con disulfuro (WO 02/103024A2) o por unión covalente del dominio A1 al dominio A2 (WO2006/108590).

Otro enfoque para aumentar la semi-vida funcional de FVIII o VWF es por PEGilación de FVIII (WO 2007/126808, WO 2006/053299, WO 2004/075923) o por PEGilación de VWF (WO 2006/071801), en cuyo caso el VWF PEGilado por tener una semi-vida aumentada podría aumentar también indirectamente la semi-vida de FVIII presente en el plasma. Se han descrito también proteínas de fusión de FVIII (WO 2004/101740, WO2008/077616 y WO 2009/156137).

WO 2013/167. 303 describe un método adicional para aumentar la semi-vida de VWF utilizando residuos azúcar derivados del antígeno del grupo sanguíneo ABO(H).

VWF, que está ausente, funcionalmente deficiente o disponible sólo en cantidad reducida en formas diferentes de la enfermedad de von Willebrand (VWD), es una glicoproteína multímera adhesiva presente en el plasma de los mamíferos, que tiene funciones fisiológicas múltiples. Durante la hemostasis primaria VWF actúa como mediador entre receptores específicos en la superficie de las plaquetas y componentes de la matriz extracelular tales como el colágeno. Además, VWF sirve como proteína portadora y estabilizadora para el FVIII procoagulante. VWF es sintetizado en las células endoteliales y los megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de cDNA del VWF tipo salvaje se describen en Collins et al. 1987, Proc Natl. Acad. Sci. USA 84:4393-4397. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, está constituido por un péptido señal de 22 residuos, un pro-péptido de 741 residuos y el polipéptido de 2050 residuos encontrado en el VWF plasmático maduro (Fischer et al., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Después de la escisión del péptido señal en el retículo endoplasmático se forma un puente disulfuro C-terminal entre dos monómeros de VWF. Durante el transporte ulterior a lo largo del camino secretor se añaden cadenas laterales carbohidrato unidas a N y unidas a O. Y lo que es más importante, los dímeros de VWF se multimerizan por puentes disulfuro N-terminales y la longitud del propéptido de 741 aminoácidos es escindida por la enzima PACE/furina en el aparato de Golgi tardío. Tanto el propéptido como los multímeros de peso molecular alto de VWF (VWF-HMWM) se almacenan en los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales o en los gránulos α de las plaquetas.

Una vez secretada en el plasma, la proteasa ADAMTS13 escinde VWF dentro del dominio A1 de VWF. El VWF plasmático está constituido por tanto por una amplia gama de multímeros que van desde dímeros simples de 500 kDa a multímeros constituidos por hasta más de 20 dímeros de un peso molecular superior a 10,000 kDa. Los multímeros de VWF de alto peso molecular (HMWM) tienen la actividad hemostática más fuerte, que puede medirse en actividad del cofactor ristocetina (VWF:RCo). Cuanto mayor es la ratio de VWF:RCo/antígeno de VWF, tanto mayor es la cantidad relativa de multímeros de peso molecular alto.

Los defectos en VWF son causantes de la enfermedad de von Willebrand (VWD), que se caracteriza por un fenotipo hemorrágico más o menos pronunciado. La VWD tipo 3 es la forma más severa, en la cual VWF está completamente ausente. VWD tipo 1 se refiere a una pérdida cuantitativa de VWF y su fenotipo puede ser muy leve. La VWD tipo 2 se refiere a defectos cualitativos de VWF y puede ser tan grave como VWD tipo 3. La VWD tipo 2 tiene muchas sub-formas, algunas de las cuales están asociadas con la pérdida o la disminución de multímeros de peso molecular alto. El tipo 2a de VWD se caracteriza por una pérdida de multímeros de peso molecular tanto intermedio como alto. La VWD tipo 2B se caracteriza por una pérdida de multímeros de peso molecular máximo.

VWD es el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente en humanos y puede tratarse por terapia de reemplazamiento con concentrados que contienen VWF de origen plasmático o recombinante.

En el plasma, FVIII se fija con afinidad alta a VWF, que lo protege del catabolismo prematuro y, por tanto, juega, además de su papel en la hemostasis primaria, un papel crucial para regular los niveles plasmáticos de FVIII, y como consecuencia es también un factor central para controlar la hemostasis secundaria. La semi-vida de FVIII no activado fijado a VWF es aproximadamente 12 a 14 horas en plasma. En la enfermedad de von Willebrand tipo 3, no existe nada o casi nada de VWF presente, siendo la semi-vida de FVIII sólo aproximadamente 6 horas, lo que conduce a síntomas de hemofilia A leve a moderada en tales pacientes debido a las concentraciones reducidas de FVIII. El efecto estabilizador de VWF sobre FVIII se ha utilizado también para favorecer la expresión recombinante de FVIII en células CHO (Kaufman et al. 1989, Mol Cell Biol).

Hay necesidad de productos y métodos para aumentar la semi-vida de VWF, FVIII o de ambos factores.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Los inventores de esta solicitud encontraron que los monómeros de VWF se fijan fuertemente al miembro A de la familia 10 del dominio de lectinas tipo calcio (CLEC10A), una proteína receptora presente en los macrófagos. En particular, se encontró que un anticuerpo capaz de fijarse al ortólogo de ratón de CLEC10A tenía un efecto inhibidor sobre el aclaramiento de VWF en los ratones. Así, por reducir el aclaramiento de VWF, los anticuerpos inhibidores capaces de fijarse a CLEC10A prolongan la semi-vida de VWF en plasma. Por administración de tales anticuerpos inhibidores puede aumentarse también la semi-vida de FVIII.

La presente descripción se refiere por tanto a la materia objeto definida en los apartados [1] a [18]:

[1] Un compuesto capaz de fijarse a la proteína receptora humana CLEC10A o un ortólogo de la misma para uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre.

[2] El compuesto para uso conforme al apartado [1], en donde dicho compuesto es capaz de inhibir la fijación del factor von Willebrand a CLEC10A.

[3] El compuesto para uso conforme al apartado [1] o [2], en donde dicho compuesto se fija específicamente a la CLEC10A.

[4] El compuesto para uso conforme a uno cualquiera de los apartados anteriores, en donde dicho compuesto es un anticuerpo o un fragmento del mismo.

[5] El compuesto para uso conforme al apartado [4], en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[6] El compuesto para uso conforme a uno cualquiera de los apartados anteriores, en donde dicha CLEC10A tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1 ó 2.

[7] El compuesto para uso conforme a uno cualquiera de los apartados anteriores, en donde la semi-vida del factor von Willebrand se aumenta por el tratamiento.

[8] El compuesto para uso conforme a uno cualquiera de los apartados anteriores, en donde la semi-vida del Factor VIII se aumenta por el tratamiento.

[9] El compuesto para uso conforme a uno cualquiera de los apartados anteriores, en donde dicho tratamiento comprende administrar un polipéptido seleccionado del grupo constituido por Factor VIII, factor von Willebrand y combinaciones de los mismos.

[10] El compuesto para uso conforme al apartado [9], en donde dicho compuesto y dicho polipéptido se administran por separado.

[11] El compuesto para uso conforme a uno cualquiera de los apartados anteriores, en donde dicho trastorno de la coagulación de la sangre es hemofilia A o enfermedad de von Willebrand.

[12] un kit farmacéutico que comprende (i) un primer compuesto como se define en uno cualquiera de los apartados 1 a 6 y (ii) un polipéptido seleccionado del grupo constituido por Factor VIII, factor von Willebrand y combinaciones de los mismos.

[13] El kit farmacéutico del apartado [12], en donde dicho compuesto y dicho polipéptido están contenidos en composiciones separadas.

[14] El uso de un compuesto como se define en uno cualquiera de los apartados [1] a [6] para aumentar la semi-vida o reducir el aclaramiento del factor von Willebrand.

[15] El uso de un compuesto como se define en uno cualquiera de los apartados [1] a [6] para aumentar la semi-vida del Factor VIII.

[16] Un compuesto como se define en uno cualquiera de los apartados [1] a [6] para uso en la prolongación de la semi-vida del factor von Willebrand en un tratamiento terapéutico.

[17] Un método de aumento de la semi-vida o reducción del aclaramiento del factor von Willebrand *in vivo*, que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de un compuesto como se define en uno cualquiera de los apartados [1] a [6].

[18] Un método de tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, que comprende administrar a un paciente que se encuentra en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto como se define en uno cualquiera de los apartados [1] a [6].

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Interacción de VWF humano monómero con CLEC10A humana recombinante (véase Ejemplo 1).

Figuras 2 y 3: Interacción de VWF humano monómero con CLEC10A humana recombinante y con las proteínas CLEC10A ortólogas de ratón (MGL1 y MGL2) (véase Ejemplo 2).

Figura 4: Inhibición de la fijación de VWF a MGL2 en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-MGL1/2 (véase Ejemplo 3).

Figura 5: PK de VWF humano en presencia de un anticuerpo anti-MGL1/2 neutralizante de la función del receptor respectivo *in vivo* (véase Ejemplo 4).

Ratones deficientes en VWF recibieron 8 mg por kg de peso corporal de un anticuerpo policlonal de cabra anti-MGL1/2. Se utilizó un anticuerpo inespecífico de cabra como tratamiento de control. Subsiguientemente, se inyectó VWF humano (200 UI/kg de peso corporal) y se presenta VWF: Ag como el porcentaje de la dosis de VWF inyectada recuperada en plasma en el tiempo indicado después de la inyección. La administración del anticuerpo inhibidor anti-MGL1/2 condujo a una disminución en el aclaramiento de VWF, cuando se compara con el grupo que recibió el anticuerpo de control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo capaz de fijarse a proteína receptora humana CLEC10A o un ortólogo de la misma para uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre.

En otros aspectos, la presente invención se refiere a un compuesto capaz de fijarse a CLEC10A humana o un ortólogo de la misma para uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, en donde dicho compuesto

(i) es un anticuerpo,
(ii) es capaz de fijarse específicamente a CLEC10A humana o un ortólogo de la misma;
(iii) no comprende un residuo azúcar accesible que forma parte de o se deriva de antígenos del grupo sanguíneo ABO(H),
(iv) no se fija a la proteína receptora CLEC10A o un ortólogo de la misma por una estructura de carbohidrato que puede formar parte de dicho compuesto,

(v) no se fija al receptor ASGP humano,
(vi) no se fija al receptor CLEC4M humano,
(vii) no se fija al receptor SCARA5 humano,
(viii) no se fija al receptor MMR humano,
(ix) no se fija al receptor CLEC4F humano, y/o
(x) no se fija al receptor COLEC12 humano.

CLEC10A

CLEC10A, conocida también como lectina tipo Gal de los macrófagos, es una proteína receptora transmembranal humana tipo II de la familia CLEC. Sinónimos adicionales son miembro 14 de la superfamilia de lectinas tipo C, lectina 2 de los macrófagos, y CD301. CLEC10A está estrechamente relacionada con las proteínas hepáticas ASGPR, pero es expresada por monocitos intermedios, macrófagos y células dendríticas. No obstante, CLEC10A y ASGPR son proteínas diferentes con localización celular y especificidad de carbohidratos distintas. Se ha comunicado que CLEC10A está implicada en el reconocimiento de patógenos por las células dendríticas y reconoce selectivamente las glicoproteínas asociadas a tumores en la incidencia del cáncer (van Vliet et al. (2005) International Immunology, 17: 661-669; Napoletano et al. (2012) European Journal of Immunology, 42: 936-945). Este receptor fue descrito como mediador de la fijación a glicoproteínas que contienen residuos terminales GalNAc enlazados en α- y β-. Estructuras de carbohidrato enlazadas a O, tales como las estructuras del antígeno Tn (GalNAc enlazado en α- a serina/treonina) y sialil-antígeno-Tn, han sido identificadas como parejas de interacción preferidas de CLEC10A (van Vliet et al. (2005) International Immunology, 17: 661-669; Saeland et al. (2007) Cancer Immunology, Immunotherapy, 56: 1225-1236; van Vliet et al. (2008) International Immunology, 29:83-90; Denda-Nagal et al. (2010) The Journal of Biological Chemistry, 285: 19193-19204; Mortezai et al. (2013) Glycobiology, 23: 844-852). Muchas células tumorales exhiben glicosilación aberrante debido a niveles de expresión y actividades de glicosiltransferasas alterados, lo cual da como resultado la expresión anormal de glucanos, tales como el antígeno Tn (van Vliet et al. (2008) International Immunology, 29: 83-90.).

Como se utiliza en esta memoria, el término "CLEC10A" hace referencia a una proteína humana que tiene o está constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:1 o una variante de la misma existente naturalmente. CLEC10A incluye, pero sin carácter limitante, proteínas que tienen o están constituidas por las secuencias de aminoácidos que se muestran en la base de datos UniProt bajo los identificadores Q8UIN9-1, Q8UIN9-2, y Q8UIN9-3. Muy preferiblemente, la CLEC10A comprende o está constituida por la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2.

Ortólogos de CLEC10A se han identificado en varias especies, que incluyen ratón, rata y pez cebra. Los humanos llevan un solo gen para CLEC10A, mientras que el ratón tiene dos genes MGL1 y MGL2 estrechamente afines. Las proteínas receptoras murinas se expresan también en macrófagos y células dendríticas inmaduras. CLEC1oA humana y las proteínas receptoras murinas exhiben un alto grado de homología al nivel de aminoácidos. Dentro del dominio de reconocimiento de carbohidratos, CLEC10A humana comparte aproximadamente 60% de identidad de secuencia de aminoácidos con ambos MGL1 y MGL de ratón (Suzuki et al. (1996) The Journal of Immunology, 156: 128-135). Una preferencia similar de ligandos es exhibida por CLEC10A humana, MGL1 de ratón y MGL2 de ratón, y estudios de fijación comunicados con anterioridad han demostrado que las 3 proteínas receptoras reconocen Gal- y GalNAc-afín (Suzuki et al. (1996) The Journal of Immunology, 156: 128-135; Oo-puthinan et al. (2008) Biochimica et Biophysica Acta, 1780: 89-100). MGL1 y MGL2 son sumamente homólogos uno a otro en sus secuencias de aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad de aminoácidos) y comparten un alto grado de identidad en el dominio de reconocimiento de carbohidratos (Tsuiji et al. (2002) The Journal of Biological Chemistry, 277: 28892-28901; Oo-puthinan et al. (2008) Biochimica et Biophysica Acta, 1780: 89-100).

Sano et al. 2006, da a conocer anticuerpos monoclonales bloqueantes y no bloqueantes contra CLEC10A, pero no se refiere a la fijación de vWF.

Ortólogos preferidos de acuerdo con esta descripción incluyen:

- ortólogos de ratón (*mus musculus*) v. g. un polipéptido que tiene o está constituido por una secuencia de aminoácidos definida por uno de los identificadores de UniProt P49300, F8WHB7 y Q8JZN1;
- ortólogo(s) de rata (*rattus norvegicus*), v. g. un polipéptido que tiene o está constituido por la secuencia de aminoácidos definida por el identificador de UniProt: P49301);
- ortólogo(s) de conejo (*oryctolagus cuniculus*),
- ortólogo(s) de cobayo (*cavia porcellus*),
- ortólogo(s) de macaco *fascicularis* y
- ortólogo(s) de macaco *mulatta.*

Compuesto capaz de fijación a CLEC10A

El tipo o clase del compuesto capaz de fijarse a CLEC10A (al que se hace referencia de aquí en adelante como "el (compuesto") no está particularmente limitado. Preferiblemente, sin embargo, el compuesto es un péptido o polipéptido, y muy preferiblemente el compuesto es un anticuerpo o fragmento del mismo.

El término "anticuerpo", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se fija a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular, e incluye formas de anticuerpos policlonales, monoclonales, modificados por ingeniería genética y modificadas de otros modos, que incluyen, pero sin carácter limitante, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos hetero- conjugados, (v.g., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, y tetracuerpos), anticuerpos mono-dominio (nanocuerpos) y fragmentos de fijación de antígeno de anticuerpos, que incluyen v. g. fragmentos Fab', F(ab')2, Fab, Fv, rIgG, y scFv. Además, a no ser que se indique otra cosa, debe entenderse que el término "anticuerpo monoclonal" (mAb) incluye tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')2) que son capaces de fijarse a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')2 carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación del animal o planta, y pueden tener menos fijación inespecífica de tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al, 1983, J. Nucl. Med. 24:316).

El anticuerpo de la invención es capaz de fijarse a al menos una variante de CLEC10A. En una realización preferida, el anticuerpo es capaz de fijarse a la proteína constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1. En la realización más preferida, el anticuerpo es capaz de fijarse a la proteína constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.

En otras realizaciones, el anticuerpo es capaz de fijarse al dominio extracelular de CLEC10A, v. g. a un epítopo dentro de los aminoácidos 261 - 316 de SEQ ID NO:2.

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención se fija al sitio de fijación de lectina de CLEC10A.

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención se fija a CLEC10A por residuos de aminoácido en la región variable. Más preferiblemente, el anticuerpo de la invención no contiene un residuo azúcar accesible que se deriva de un antígeno del grupo sanguíneo ABO(H), el anticuerpo no comprende un residuo azúcar accesible que es galactosa, fucosa o N-acetilgalactosamina. Aún más preferiblemente, el anticuerpo no contiene un sitio de glicosilación en la región Fc, v. g. el anticuerpo es una IgG con una mutación del residuo N297 conforme a la numeración de Kabat. Muy preferiblemente, el anticuerpo no está glicosilado.

Se prefiere también que el anticuerpo se fije específicamente a CLEC10A. En una realización, el anticuerpo es capaz de fijarse a CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a dos o más, preferiblemente a la totalidad de los receptores siguientes: ASGPR1, COLEC12, CLEC4F, CLEC4M, SCARA5 y MMR.

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a ASGPR1 (identificador de UniProt: P07306).

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a COLEC12 (identificador de UniProt: Q5KU26).

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a CLEC4F (identificador de UniProt: Q8N1N0).

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a CLEC4M (identificador de UniProt: Q9H2X3).

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a SCARA5 (identificador de UniProt: Q6ZMJ2).

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a MMR (identificador de UniProt: P22897).

En todavía otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse a CLEC10A, pero no es capaz de fijarse a uno cualquiera de los receptores siguientes: ASGPR1, COLEC12, CLEC4F, CLEC4M, SCARA5 y MMR.

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse a al menos un ortólogo murino de CLEC10A. En dicha realización, el anticuerpo puede ser capaz de fijarse a MGL1, a MGL2, o tanto a MGL1 como a MGL2. El anticuerpo puede ser capaz de fijarse a una proteína que tiene o está constituida por la secuencia de aminoácidos definida en el identificador de UniProt No. P49. 300. El anticuerpo puede ser capaz de fijarse a una proteína que tiene o está constituida por la secuencia de aminoácidos definida en el identificador de UniProt No. F8WHB7. El anticuerpo puede ser capaz de

fijarse a una proteína que tiene o está constituida por la secuencia de aminoácidos definida en el identificador de UniProt No. Q8JZN1.

En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse al ortólogo de rata de CLEC10A. En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse al ortólogo de conejo de CLEC10A. En otra realización, el anticuerpo es capaz de fijarse al ortólogo de macaco *fascicularis* y/o al ortólogo de macaco *mulatta* de CLEC10A.

La fijación del anticuerpo a CLEC10A puede determinarse como se describe en el Ejemplo 1 más adelante en esta memoria.

La constante de disociación K_D para el complejo formado por CLEC10A y el anticuerpo es preferiblemente menor que 100 nM, más preferiblemente menor que 10 nM, y muy preferiblemente menor que 5 nM. Típicamente, el valor K_D oscila desde aproximadamente 10 pM a aproximadamente 100 nM, o desde aproximadamente 100 pM a aproximadamente 10 nM, o desde aproximadamente 500 pM a aproximadamente 5 nM.

Preferiblemente, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en esta memoria no está limitada a anticuerpos producidos por tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier con eucariota, procariota, o de fago, y no al método por el cual se produce el mismo. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando una gran diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de presentación de fago, o una combinación de las mismas. (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N. Y.).

En otras realizaciones, que incluyen el uso *in vivo* de los anticuerpos anti-CLEC10A en humanos, pueden utilizarse anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados, o humanos. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano o anticuerpo monoclonal humanizado.

El término anticuerpo "quimérico" como se utiliza en esta memoria se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina no humana, tal como un anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulinas humanas, seleccionadas típicamente de un molde de inmunoglobulina humano. Métodos para producción de anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, v.g., Morrison, 1985, Science 229 (4719): 1202-7; Oi et al, 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202; U. S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816397.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (v. g., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de fijación de diana de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de un molde de inmunoglobulina humana seleccionado. La humanización es una técnica para fabricar un anticuerpo quimérico en el cual uno o más aminoácidos o porciones del dominio variable humano han sido sustituidos por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se fijan al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la especie no humana y regiones marco (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos marco en las regiones marco humanas estarán sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la fijación de antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, v.g., por modelización de las interacciones de la CDR y residuos marco para identificar residuos marco importantes para la fijación de antígeno y comparación de secuencia a fin de identificar residuos marco extraños en posiciones particulares. Véase, v.g., Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7 y Queen et al, U. S. Patent Nos: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 54 6,180,370.

Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP239400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes U. S. Nos. 5,225,539; 5,530,101 y 5,585,089), revestimiento o reparación de la superficie (EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol, 28:489-498; Studnicka et al, 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973, y desordenamiento de cadena (Patente U. S. No. 5,565,332).

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados se preparan como se describe en Queen et al, Patentes U. S. Nos: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 16,180,370.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son anticuerpos humanos. Los anticuerpos anti-CLEC10A completamente "humanos" pueden ser deseables para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Como se utiliza

en esta memoria, los "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos humanos pueden fabricarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de presentación de fago descritos anteriormente utilizando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse las Patentes US Nos. 4,444,887 y 4,716,111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 97/10741.

Pueden producirse también anticuerpos humanos utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanos. Véanse, v. g., las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patentes U. S. Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; y 5,939,598.

Anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítopo seleccionado pueden generarse utilizando una técnica a la que se hace referencia como "selección guiada. " En este enfoque, se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, v. g., un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítopo (Jespers et al, 1988, Biotechnology 12:899-903).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son anticuerpos primatizados. La expresión "anticuerpo privatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Métodos para producir anticuerpos primatizados se conocen en la técnica. Véanse, v.g., las Patentes U. S. Nos. 5,658,570; 5,681,722; y 5,693,780.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de fijación para al menos dos antígenos diferentes. En los anticuerpos biespecíficos útiles en los presentes métodos, las especificidades de fijación pueden estar dirigidas hacia dos epítopos específicos diferentes en CLEC10A, bloqueando con ello la fijación de VWF aún más eficazmente que con un anticuerpo monoespecífico.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son anticuerpos derivatizados. Por ejemplo, pero no como limitación, los anticuerpos derivatizados que se han modificado, v.g., por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína (véase más adelante para una discusión de conjugados de anticuerpos), etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas puede realizarse por técnicas conocidas, que incluyen, pero sin carácter limitante, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede conceder uno o más aminoácidos no clásicos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo cuya secuencia se ha modificado para reducir al menos una función efectora biológica mediada por región constante con relación a la secuencia tipo salvaje correspondiente. Para modificar un anticuerpo anti-CLEC10A de tal modo que el mismo exhiba fijación reducida al receptor Fc, el segmento de la región constante de inmunoglobulina del anticuerpo puede mutarse en regiones particulares necesarias para las interacciones con el receptor Fc (FcR) (véase, v.g., Canfield y Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173 : 1483-1491; y Lund et al, 1991, J. Immunol. 147:2657-2662). La reducción en la capacidad de fijación a FcR del anticuerpo puede reducir también otras funciones efectoras que están basadas en interacciones con FcR, tales como opsonización y fagocitosis y citotoxicidad celular dependiente de antígeno.

En otro aspecto adicional, los anticuerpos anti-CLEC10A o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se han modificado para aumentar o reducir sus afinidades de fijación al receptor Fc fetal FcRn. Para alterar la afinidad de fijación a FcRn, el segmento de región constante de inmunoglobulina del anticuerpo puede mutarse en regiones particulares necesarias para las interacciones con FcRn (véase, v.g., WO 2005/123780). El aumento de la afinidad de fijación a FcRn aumentaría la semi-vida del anticuerpo en suero, y la reducción de la afinidad de fijación para FcRn, por el contrario, reduciría la semi-vida en suero del anticuerpo. En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CLEC10A es de la clase IgG, en la cual al menos uno de los residuos de aminoácido 250, 314, y 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con un residuo de aminoácido diferente del que está presente en el anticuerpo sin modificar. Los anticuerpos de la clase IgG incluyen anticuerpos de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. La sustitución puede hacerse en la posición 250, 314, o 428 sola, o en cualesquiera combinaciones de las mismas, tal como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314, o en las posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314, y 428, siendo las posiciones 250 y 428 una combinación preferida. Para cada posición, el aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido diferente del que está presente en dicha posición del anticuerpo sin modificar. Para la posición 250, el residuo de aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de treonina, incluyendo, pero sin carácter limitante, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, valina, triptófano, o tirosina. Para la posición 314, el residuo de aminoácido sustituyente puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de leucina, incluyendo, pero sin carácter limitante, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina,

serina, valina, triptófano, o tirosina. Para la posición 428, los residuos de aminoácido sustituyentes pueden ser cualquier residuo de aminoácido distinto de metionina, incluyendo, pero sin carácter limitante, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, o tirosina. Combinaciones específicas de sustituciones de aminoácidos adecuadas se identifican en la Tabla 1 de WO 2005/123780.

Véase también, Hinton et al, Patentes US Nos. 7,217,797, 7,361,740, 7,365,168, y 7,217,798.

En otros aspectos adicionales, un anticuerpo anti-CLEC10A tiene uno o más aminoácidos insertados en una o más de sus regiones hipervariables, por ejemplo, como se describe en US 2007/0280931.

Conjugados de Anticuerpos

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A son conjugados de anticuerpos que están modificados, v.g., por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal manera que la unión covalente no interfiere con la fijación a CLEC10A. Métodos para conjugación de moléculas efectoras a anticuerpos son bien conocidos en la técnica (Véase, v.g., Hellstrom et al, Controlled Drag Delivery, 2nd Ed. , en pp. 623-53 (Robinson et al, eds. , 1987)); Thorpe et al, 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics 83:67-123).

En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo se fusiona por un enlace covalente (v.g., un enlace peptídico), opcionalmente en el término N o el término C, a una secuencia de aminoácido de otra proteína (o porción de la misma; preferiblemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo, se enlaza a la otra proteína en el término N del dominio constante del anticuerpo. Pueden utilizarse procedimientos de DNA recombinante para crear tales fusiones, por ejemplo, como se describe en WO 86/01533 y EP0392745. En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semi-vida *in vivo*. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de fijación de albúmina o compuestos de fijación de albúmina tales como los descritos en WO 2005/117984.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CLEC10A pueden estar unidos a restos polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, los restos PEG pueden estar unidos por cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo libre amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Tales aminoácidos pueden existir naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden estar modificados por ingeniería genética en el fragmento utilizando métodos de DNA recombinante. Véase por ejemplo la Patente U. S. No. 5,219,996. Pueden utilizarse sitios múltiples para unir dos o más moléculas PEG. Preferiblemente, los restos PEG se unen covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. En el caso de utilización de un grupo tiol como punto de unión, pueden utilizarse restos efectores activados adecuadamente, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína.

En otro ejemplo, un conjugado de anticuerpo anti-CLEC10A es un fragmento Fab' modificado que está PEGilado, es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, v. g. conforme al método descrito en EP0948544. Véanse también Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications, (J. Milton Harris and S. Zalipsky, eds. , American Chemical Society, Washington D. C, 1997); y Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam y A. Dent, eds. , Grove Publishers, New York, 1998); y Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531- 545.

Tratamiento de los trastornos de la coagulación

Los anticuerpos anti-CLEC10A descritos en esta memoria son útiles para tratamiento de trastornos de la coagulación que incluyen, pero sin carácter limitante, hemofilia y enfermedad de von Willebrand. Preferiblemente, la enfermedad es hemofilia A o enfermedad de von Willebrand.

La expresión "hemofilia A" se refiere a una deficiencia en el factor funcional de la coagulación FVIII, que usualmente es hereditaria.

La expresión "enfermedad de von Willebrand" (VWD) se refiere a una anormalidad de la coagulación asociada con una deficiencia cualitativa o cuantitativa de VWF.

El tratamiento de una enfermedad abarca el tratamiento de pacientes que están ya diagnosticados por presentar cualquier forma de la enfermedad en cualquier estadio o manifestación clínica; el retardo de la aparición o evolución o agravación o deterioro de los síntomas o signos de la enfermedad; y/o la prevención y/o reducción de la gravedad de la enfermedad.

Un "individuo" o "paciente" al que se administra un anticuerpo anti-CLEC10A puede ser un mamífero, tal como un animal no-primate (v.g., vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, etc.) o primate (v.g., mono o humano). Preferiblemente, el paciente es un humano. En ciertos aspectos, el humano es un paciente pediátrico. En otros aspectos, el humano es un paciente adulto.

En esta memoria se describen composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CLEC10A y, opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los segundos agentes terapéuticos descritos más adelante. Las composiciones se suministran típicamente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede encontrarse en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración de la misma a un paciente).

Los anticuerpos anti-CLEC10A pueden administrarse a un paciente por una diversidad de rutas tales como las rutas oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal, tópica o local. La ruta de administración más adecuada dependerá en cualquier caso dado del anticuerpo particular, el individuo, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad, así como del estado físico del individuo. Típicamente, un anticuerpo anti-CLEC10A se administrará por vía intravenosa.

En realizaciones típicas, un anticuerpo anti-CLEC10A está presente en una composición farmacéutica a una concentración suficiente para permitir la administración intravenosa a 0,5 mg/kg hasta 20 mg/kg. En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpo adecuada para uso en las composiciones y métodos descritos en esta memoria incluye, pero sin carácter limitante, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, o una concentración que oscila entre cualesquiera de los valores anteriores, v.g., 1 mg/kg a 10 mg/kg, 5 mg/kg a 15 mg/kg, o 10 mg/kg a 18 mg/kg.

La dosis eficaz de un anticuerpo anti-CLEC10A puede oscilar desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 750 g/kg por administración simple (v.g., bolus), administraciones múltiples o administración continua, o hasta alcanzar una concentración sérica de 0,01-5000 µg/ml de concentración en suero por administración simple (v.g., bolus), administraciones múltiples o administración continua, o cualquier intervalo o valor eficaz en ella dependiendo de la condición que se esté tratando, la ruta de administración y la edad, peso y estado del individuo. En ciertas realizaciones, cada dosis puede oscilar desde aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal o desde aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal. El anticuerpo puede formularse como una solución acuosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un anticuerpo anti-CLEC10A por dosis. Dicha unidad puede contener 0,5 mg a 5 g, por ejemplo, pero sin carácter limitante, 1 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 750 mg, 1000 mg, o cualquier intervalo comprendido entre dos cualesquiera de los valores que anteceden, por ejemplo 10 mg a 1000 mg, 20 mg a 50 mg, o 30 mg a 300 mg. Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden presentar una gran diversidad de formas dependiendo, v.g., de la condición a tratar o de la ruta de administración.

La determinación de la dosis eficaz, el número total de dosis, y la duración del tratamiento con un anticuerpo anti-CLEC10A está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, y puede determinarse utilizando un estudio estándar de escalación de dosis.

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-CLEC10A adecuados en los métodos descritos en esta memoria pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas por mezcla del anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales empleados típicamente en la técnica (a todos los cuales se hace referencia en esta memoria como "vehículos"), es decir, agentes tampón, agentes estabilizadores, conservantes, isotonificantes, detergentes no iónicos, antioxidantes, y otros diversos aditivos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 16ª (Osol, ed. 1980). Tales aditivos deben ser no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

Los agentes tampón ayudan a mantener el pH en el intervalo aproximado a las condiciones fisiológicas. Los mismos pueden estar presentes a concentraciones comprendidas entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 50 mM. Agentes tampón adecuados incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones citrato (v.g., mezcla citrato monosódico-citrato disódico, mezcla ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones succinato (v.g., mezcla ácido succínico-succinato monosódico, mezcla ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones tartrato (v.g., mezcla ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones fumarato (v.g., mezcla ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones gluconato (v.g., mezcla ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla ácido glucónico-gluconato potásico, etc.), tampones oxalato (v.g., mezcla ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla ácido oxálico-oxalato potásico, etc), tampones lactato (v.g., mezcla ácido láctico-lactato de sodio, mezcla ácido láctico-

hidróxido de sodio, mezcla ácido láctico-lactato potásico, etc.) y tampones acetato (v.g., mezcla ácido acético-acetato de sodio, ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente, pueden utilizarse tampones fosfato, tampones histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Pueden añadirse conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y pueden añadirse en cantidades que oscilan desde 0,2 % a 1% (peso/volumen). Conservantes adecuados incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil-parabén, propil-parabén, cloruro de octadecil-dimetilbencil-amonio, haluros de benzalconio (v.g., cloruro, bromuro, y yoduro), cloruro de hexametonio, y alquil-parabenes tales como metil- o propil-parabén, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3-pentanol. Pueden añadirse isotonificantes conocidos a veces como "estabilizadores" a fin de asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas, e incluyen alcoholes-azúcar polivalentes, preferiblemente alcoholes-azúcar trivalentes o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizadores hacen referencia a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función desde un agente de aumento de volumen a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Estabilizadores típicos pueden ser alcoholes azúcar polivalentes (enumerados arriba); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc. , azúcares orgánicos o alcoholes-azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y análogos, con inclusión de ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α-monotioglicerol, y tiosulfato de sodio; polipéptidos de peso molecular bajo (v.g., péptidos de 10 residuos o menos); proteínas tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10. 000 partes en peso por parte en peso de proteína activa.

Pueden añadirse surfactantes o detergentes no iónicos (conocidos también como " agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, lo que permite también que la formulación se exponga a cizallamiento superficial forzado sin causar desnaturalización de la proteína. Surfactantes no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188 etc.), polioles Pluronic, monoéteres de polioxietilen-sorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los surfactantes no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml hasta aproximadamente 1,0 mg/ml, o en un intervalo de aproximadamente 0,07 mg/ml hasta aproximadamente 0,2 mg/ml.

Excipientes diversos adicionales incluyen agentes de aumento de volumen (v.g., almidón), agentes quelantes (v.g., EDTA), antioxidantes (v.g., ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y codisolventes.

La formulación de esta memoria puede contener también un segundo agente terapéutico además de un anticuerpo anti-CLEC10A. Ejemplos de segundos agentes terapéuticos adecuados se proporcionan más adelante.

La pauta de dosificación puede variar desde una vez al mes hasta una vez al día dependiendo de cierto número de factores clínicos, que incluyen el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad, y la sensibilidad del paciente al anticuerpo anti-CLEC10A. En realizaciones específicas, un anticuerpo anti-CLEC10A se administra una vez al día, dos veces por semana, tres veces por semana, cada 5 días, cada 10 días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas o una vez al mes, o dentro de cualquier intervalo comprendido entre dos cualesquiera de los valores anteriores, por ejemplo, desde cada cuatro semanas a cada mes, desde cada 10 días a cada dos semanas, o de dos a tres veces por semana, etc.

La dosificación de un anticuerpo anti-CLEC10A a administrar variará de acuerdo con el anticuerpo particular, el individuo, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad, el estado físico del individuo, el régimen terapéutico (v.g., si se utiliza un segundo agente terapéutico), y la ruta de administración seleccionada; la dosificación apropiada puede ser determinada fácilmente por una persona experta en la técnica.

Un agente experto en la técnica reconocerá que la cantidad y el espaciamiento óptimos de las dosis individuales de un anticuerpo anti-CLEC10A estarán determinados por la naturaleza y alcance de la condición que se esté tratando, la forma, ruta y sitio de administración, y la edad y condición del individuo particular de que se trate, y que un médico puede determinar finalmente las dosis apropiadas a utilizar. Esta dosis puede repetirse tantas veces como sea apropiado. Si se producen efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosis puede alterarse o reducirse, de acuerdo con la práctica clínica normal.

Terapia de combinación

Preferiblemente, el paciente a tratar con el anticuerpo anti-CLEC10A se trata también con una terapia convencional de los trastornos de la coagulación. Por ejemplo, un paciente que sufre hemofilia se trata también típicamente con un factor de coagulación de la sangre, v. g. Factor VIII, VWF o combinaciones de los mismos.

La expresión "factor von Willebrand" (VWF) como se utiliza en esta memoria incluye VWF existente naturalmente, pero también variantes del mismo, v.g., fragmentos, proteínas de fusión o conjugados, o variantes de secuencia en las cuales se han insertado, delecionado o sustituido uno o más residuos, reteniendo la actividad biológica del VWF existente naturalmente. La actividad biológica se retiene en el sentido de la invención si la variante de VWF retiene al menos 10%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, y muy preferiblemente al menos 75% de al menos una de las actividades biológicas de VWF tipo salvaje. La actividad biológica de VWF tipo salvaje y variantes del mismo puede ser determinada por el experto utilizando métodos de actividad del cofactor ristocetina (Federici A B et al. 2004. Haematologica 89:77-85), fijación de VWF a GP Ibα del complejo plaquetas-glicoproteína Ib-V-IX (Sucker et al. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12:305-310), un ensayo de fijación de colágeno (Kallas & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80:466-471), o fijación a Factor VIII.

Los términos "Factor VIII" y "FVIII" se utilizan en esta memoria como sinónimos. "FVIII" incluye variaciones alélicas naturales de FVIII que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. FVIII puede derivarse de plasma o producirse recombinantemente, utilizando métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y la localización de la glicosilación, sulfatación de la tirosina y otras modificaciones posteriores a la traducción pueden variar, dependiendo de la célula hospedadora elegida y sus condiciones de cultivo.

El término FVIII incluye análogos de FVIII. El término "análogo de FVIII" como se utiliza en esta memoria se refiere a una molécula de FVIII (de longitud total o truncada/delecionada en el dominio B, o FVIII monocatenario) en la que uno o más aminoácidos han sido sustituidos o delecionados comparada con la secuencia de aminoácidos de FVIII tipo salvaje (es decir la secuencia definida por el identificador UniProt P00451) o, para moléculas de FVIII truncadas/delecionadas en el dominio B, la parte correspondiente de dicha secuencia de aminoácidos. Los análogos de FVIII no existen en la naturaleza, pero se obtienen por manipulación humana.

Las moléculas de Factor VIII utilizadas conforme a la presente invención pueden ser también moléculas de FVIII truncadas/delecionadas en el dominio B en las cuales los dominios remanentes corresponden a las secuencias que se indican en los números de aminoácidos 1-740 y 1649-2332 de la secuencia de aminoácidos de FVIII tipo salvaje. Otras formas de moléculas de FVIII delecionadas en el dominio B tienen además una deleción parcial en su dominio a3, que conduce a moléculas FVIII monocatenarias.

De ello se sigue que estas moléculas FVIII son moléculas recombinantes producidas en células hospedadoras transformadas, preferiblemente de origen mamífero. Sin embargo, los dominios remanentes en un FVIII delecionado en el dominio B, (es decir los tres dominios A, los dos dominios C y las regiones a1, a2 y a3) pueden diferir ligeramente, v.g., aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de la secuencia de aminoácidos tipo salvaje respectiva (aminoácidos 1-740 y 1649-2332).

Las moléculas FVIII utilizadas conforme a la presente invención pueden ser moléculas FVIII bicatenarias o moléculas FVIII monocatenarias. Las moléculas FVIII incluidas en la composición de la presente invención puede ser también fragmentos biológicamente activos de FVIII, es decir FVIII en donde uno o más dominios distintos del dominio B ha/han sido delecionados o truncados, pero en donde la molécula FVIII en la forma delecionada/truncada retiene su capacidad para respaldar la formación de un coágulo de sangre. La actividad de FVIII puede evaluarse in vitro utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un test preferido para determinación de la actividad de FVIII conforme a esta invención es el ensayo del sustrato cromógeno o el ensayo de una sola etapa (véase más adelante). Pueden introducirse modificaciones (sustituciones, deleciones, etc.) de aminoácidos en los dominios remanentes, v.g., a fin de modificar la capacidad de fijación de Factor VIII con diversos otros componentes tales como v. g. factor von Willebrand (vWF), proteína afín al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR), diversos receptores, otros factores de la coagulación, superficies celulares, etc. o a fin de introducir y/o anular sitios de glicosilación, etc. Otras mutaciones que no anulan la actividad de FVIII pueden acomodarse también en una molécula/análogo de FVIII para uso en una composición de la presente invención.

Los análogos de FVIII incluyen también moléculas de FVIII en las cuales uno o más de los residuos de aminoácido del polipéptido precursor han sido delecionados o sustituidos con otros residuos de aminoácido, y/o en las cuales se han añadido residuos de aminoácido adicionales al polipéptido FVIII precursor.

Adicionalmente, las moléculas/análogos de Factor VIII pueden comprender otras modificaciones en v. g. el dominio B truncado y/o en uno o más de los otros dominios de las moléculas ("derivados de FVIII"). Estas otras modificaciones pueden encontrarse en la forma de diversas moléculas conjugadas a la molécula de Factor VIII, tales como v. g. compuestos polímeros, compuestos peptídicos, compuestos derivados de ácidos grasos, etc.

El término FVIII incluye FVIII glicopegilado. El presente contexto, el término "FVIII glicopegilado" tiene por objeto designar una molécula de Factor VIII (con inclusión de FVIII de longitud total y FVIII truncado/delecionado en el dominio B) en donde uno o más grupos PEG se ha/han unido al polipéptido FVIII por la o las cadenas laterales de polisacárido (glucano(s)) del polipéptido.

El término FVIII incluye moléculas de que tienen grupos protectores o restos prolongadores de la semi-vida. Debe entenderse que las expresiones "grupos protectores"/"restos prolongadores de la semi-vida" utilizadas en esta

memoria se refieren a uno o más grupos químicos unidos a una o más funcionalidades de cadena lateral de los aminoácidos tales como -SH, -OH, -COOH, -CONH2, -NH2, o una o más estructuras de N- y/o O-glucano y que pueden aumentar la semi-vida en la circulación *in vivo* de cierto número de proteínas/péptidos terapéuticos cuando se conjugan a éstos proteínas/péptidos. Ejemplos de grupos protectores/restos prolongadores de la semi-vida incluyen: ácidos grasos biocompatibles y derivados de los mismos, hidroxialquil-almidón (HAS) v. g. hidroxietil-almidón (HES), Poly (Glyx-Sery)n (homopolímero de aminoácidos (HAP)), ácido hialurónico (HA), polímeros de heparosano (HEP), polímeros basados en fosforilcolina (polímero PC), polímeros Fleximer® (Mersana Therapeutics, MA, USA), dextrano, ácidos poli-siálicos (PSA), polietilenglicol (PEG), un dominio Fc, transferrina, albúmina, péptidos tipo elastina, polímeros XTEN® (Amunix, CA, USA), péptidos de fijación de albúmina, un fragmento del factor von Willebrand, (fragmento vWF), un péptido de terminal carboxilo (péptido CTP, Prolor Biotech, IL), y cualquier combinación de los mismos (véase, por ejemplo, McCormick, C. L. , A. B. Lowe, y N. Ayres, Water-Soluble Polymers, en Encyclopedia of Polymer Science and Technology. 2002, John Wiley & Sons, Inc.). El modo de derivatización no es crítico y puede deducirse de lo anterior.

Las moléculas de FVIII que pueden utilizarse conforme a esta invención incluyen proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos de FVIII fusionada a una secuencia de aminoácidos heteróloga, preferiblemente una secuencia de aminoácidos prolongadora de la semi-vida. Proteínas de fusión preferidas son proteínas de fusión Fc y proteínas de fusión de albúmina. Debe entenderse que la expresión "proteína de fusión Fc" empleada en esta memoria abarca FVIII fusionado a un dominio Fc que puede derivarse de cualquier isotipo de anticuerpo. En muchos casos se preferirá un dominio Fc de IgG debido a la semi-vida relativamente larga en la circulación de los anticuerpos IgG. El dominio Fc puede modificarse adicionalmente a fin de modular ciertas funciones efectoras tales como v. g. la fijación del complemento y/o fijación a ciertos receptores Fc. La fusión de FVIII con un dominio Fc, que tiene la capacidad de fijarse a los receptores FcRn, dará generalmente como resultado una semi-vida prolongada de la proteína de fusión en la circulación comparada con la semi-vida del FVIII tipo salvaje. De ello se sigue que una molécula FVIII para uso en la presente invención puede ser también un derivado de un análogo de FVIII, tal como, por ejemplo, una proteína de fusión de un análogo de FVIII, un análogo de FVIII PEGilado o glicoPEGilado, o un análogo de FVIII conjugado a un polímero de heparosano. La expresión "proteína de fusión de albúmina " empleada en esta memoria, debe entenderse que abarca FVIII fusionado a una secuencia de aminoácidos de albúmina o un fragmento o derivado de la misma. La secuencia de aminoácidos heteróloga puede fusionarse al término N o al término C de FVIII, o la misma puede estar insertada internamente en la secuencia de aminoácidos de FVIII. La secuencia de aminoácidos heterólogos puede ser cualquier "polipéptido prolongador de la semi-vida" descrito en WO 2008/077616 A 1.

Ejemplos de moléculas de FVIII para uso en las composiciones de la presente invención comprenden, por ejemplo, las moléculas de FVIII descritas en WO 2010/045568, WO 2009/062100, WO 2010/014708, WO 2008/082669, WO 2007/126808, US 2010/0173831, US 2010/0173830, US 2010/0168391, US 2010/0113365, US 2010/0113364, WO 2003/031464, WO 2009/108806, WO 2010/102886, WO 2010/115866, WO 2011/101242, WO 2011/101284, WO 2011/101277, WO 2011/131510, WO 2012/007324, WO 2011/101267, WO 2013/083858, y WO 2004/067566.

Ejemplos de moléculas de FVIII, que pueden utilizarse en una composición de la presente invención incluyen el ingrediente activo de Advate®, Helixate®, Kogenate®, Xyntha® así como la molécula de FVIII descrita en WO 2008/135501, WO 2009/007451 y el constructo designado "dBN (64-53)" de WO 2004/067566.

La concentración de Factor VIII en la composición utilizada conforme a la presente invención está comprendida típicamente en el intervalo de 10-10. 000 UI/mL. En diferentes realizaciones, la concentración de moléculas FVIII en las composiciones de la invención está comprendida en el intervalo de 10-8. 000 UI/mL, o 10-5. 000 UI/mL, o 20-3. 000 UI/mL, o 50-1. 500 UI/mL, o 3. 000 UI/mL, o 2. 500 UI/mL, o 2. 000 UI/mL, o 1. 500 UI/mL, o 1,200 UI/mL, 1. 000 UI/mL, u 800 UI/mL, o 600 UI/mL, o 500 UI/mL, o 400 UI/mL, o 300 UI/mL, o 250 UI/mL, o 200 UI/mL, o 150 UI/mL, o 100 UI/mL.

"Unidad Internacional", o "UI", es una unidad de medida de la actividad (potencia) de coagulación de la sangre de FVIII como se mide por un ensayo de actividad de FVIII tal como un ensayo de coagulación de una sola etapa o un ensayo de sustrato cromógeno de actividad de FVIII utilizando un estándar calibrado contra una preparación estándar internacional calibrada en "UI". Ensayos de coagulación de una sola etapa se conocen en la técnica, tales como el descrito en N Lee, Martin L, et al., An Effect of Predilution on Potency Assays of FVIII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511 519 (1983). Principio del ensayo de una sola etapa: El test se realiza como una versión modificada del ensayo del Tiempo Parcial de Tromboplastina activado (aPTT): la incubación de plasma con fosfolípidos y un activador de la superficie conduce a la activación de factores del sistema intrínseco de la coagulación. La adición de iones calcio desencadena la cascada de coagulación. Se determina el tiempo para la formación de un coágulo de fibrina medible. El ensayo se realiza en presencia de plasma deficiente en Factor VIII. La capacidad de coagulación del plasma deficiente se restablece por Factor VIII de la Coagulación incluido en la muestra a ensayar. El acortamiento del tiempo de coagulación es proporcional a la cantidad de Factor VIII presente en la muestra. La actividad de Factor VIII de la Coagulación se cuantifica por comparación directa con una preparación estándar que tiene una cantidad conocida de Factor VIII en Unidades Internacionales.

Otro ensayo estándar es un ensayo de sustrato cromógeno. Ensayos de sustrato cromógeno pueden adquirirse comercialmente, tales como el kit de test coamático de FVIII (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA V. le

Monza 338 - 20128 Milano, Italia). Principio del ensayo cromógeno: en presencia de calcio y fosfolípido, el Factor X es activado por Factor IXa a Factor Xa. Esta reacción es estimulada por Factor VIIIa como cofactor. FVIIIa es formado por cantidades bajas de trombina en la mezcla de reacción de FVIII en la muestra a medir. Cuando se utilizan las concentraciones óptimas de Ca2+, fosfolípido y Factor IXa y una cantidad en exceso de Factor X, la activación de Factor X es proporcional a la potencia de Factor VIII. El Factor X activado libera el cromóforo pNA del sustrato cromógeno S-2765. La liberación de pNA, medida a 405 nm, es por tanto proporcional a la cantidad de FXa formada, y, por consiguiente, también a la actividad de Factor VIII de la muestra.

En una realización, el tratamiento comprende administrar el anticuerpo anti-CLEC10A de la invención y Factor VIII a un paciente que sufre hemofilia, preferiblemente hemofilia A.

En otra realización, el tratamiento comprende administrar el anticuerpo anti-CLEC10A de la invención y VWF a un paciente que sufre hemofilia, preferiblemente hemofilia A.

En otra realización, el tratamiento comprende administrar el anticuerpo anti-CLEC10A de la invención y Factor VIII y VWF a un paciente que sufre hemofilia, preferiblemente hemofilia A.

En otra realización, el tratamiento comprende administrar el anticuerpo anti-CLEC10A de la invención y VWF a un paciente que sufre la enfermedad de von Willebrand.

En una realización particular, el anticuerpo anti-CLEC10A y el factor de coagulación de la sangre (v. g. Factor VIII, VWF o combinaciones de los mismos) se administran simultáneamente. En otra realización, el anticuerpo anti-CLEC10A y el factor de coagulación de la sangre (v. g. Factor VIII, VWF o combinaciones de los mismos) se administran por separado). El tiempo entre la administración del anticuerpo anti-CLEC10A y el factor de la coagulación de la sangre (v. g. Factor VIII, VWF o combinaciones de los mismos) no está limitado particularmente. Se prefiere que el factor de coagulación de la sangre (v. g. Factor VIII, VWF o combinaciones de los mismos) se administre antes que el anticuerpo anti-CLEC10A.

Otro aspecto de la presente invención es un kit farmacéutico que comprende (i) un primer compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria y (ii) un polipéptido seleccionado del grupo constituido por Factor VIII, factor von Willebrand y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el compuesto (con preferencia el anticuerpo) y el polipéptido están contenidos en composiciones separadas.

Otro aspecto de la presente invención es un kit farmacéutico que comprende (i) un primer compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria y (ii) un polipéptido seleccionado del grupo constituido por Factor VIII, factor von Willebrand y combinaciones de los mismos, para uso simultáneo, separado o sucesivo en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria para aumentar la semi-vida o reducir el aclaramiento del factor von Willebrand.

El término "semi-vida" se refiere al tiempo que tarda en eliminarse la mitad de la proteína de la circulación *in vivo*. El área bajo la curva (AUC) puede determinarse para evaluar los efectos de aclaramiento. Una reducción en el aclaramiento conduce a valores AUC mayores y a un aumento de la semi-vida.

Otro aspecto adicional de la invención es el uso de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria para aumentar la semi-vida del Factor VIII.

Otro aspecto adicional de la invención es un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria para uso en la prolongación de la semi-vida del factor von Willebrand en un tratamiento terapéutico.

La invención se refiere adicionalmente a un método de aumentar la semi-vida o reducir el aclaramiento del factor von Willebrand *in vivo*, que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define enteramente en esta memoria.

Un aspecto adicional de esta descripción es un método de tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, que comprende administrar a un paciente que se halla en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria.

Un aspecto adicional es el uso de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria para reducir la frecuencia de administración de FVIII en un tratamiento de la hemofilia A. La frecuencia de administración intravenosa o subcutánea de FVIII puede reducirse a dos veces por semana. Alternativamente, la frecuencia de administración intravenosa o subcutánea de FVIII puede reducirse a una sola vez por semana.

Un aspecto adicional es el uso de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria para reducir la frecuencia de administración de VWF en un tratamiento de VWD. La frecuencia de administración intravenosa o subcutánea de VWF puede reducirse a dos veces por semana. Alternativamente, la frecuencia de administración intravenosa o subcutánea de VWF puede reducirse a una sola vez por semana.

Otro aspecto es el uso de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria para reducir la dosis de FVIII a administrar en un tratando de la hemofilia A.

Otro aspecto es el uso de un compuesto (preferiblemente un anticuerpo) como se define anteriormente en esta memoria para reducir la dosis de VWF a administrar en un tratamiento de VWD.

La expresión "antígeno del grupo sanguíneo ABO(H)", como se utiliza en esta memoria, se refiere a antígenos de carbohidrato presentes en los eritrocitos que son reconocidos comúnmente por anticuerpos anti-A o anti-B. El sistema del grupo sanguíneo ABO(H) es el sistema de tipo sanguíneo más importante en la transfusión de sangre humana. El antígeno H es un precursor esencial para los antígenos de grupo sanguíneo ABO(H), y es una estructura de carbohidrato ligada principalmente a proteína, con una fracción menor unida a ceramida. El mismo se compone de una cadena de β-D-galactosa, β-D-N-acetilglucosamina, β-D-galactosa, y a-L-fucosa enlazada en posición 2. El antígeno A contiene una a-N-acetilgalactosamina unida al residuo D-galactosa en el extremo del antígeno H, mientras que el antígeno B tiene un residuo a-D-galactosa unido a la D-galactosa del antígeno H. Por tanto, los residuos azúcar terminales del sistema de grupo sanguíneo ABO(H) son galactosa, N-acetilgalactosamina y fucosa.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Interacción de VWF Humano Monómero con CLEC1OA Humana Recombinante

Materiales y Métodos

Se aplicó tecnología de resonancia de plasmones de superficie (SPR) (Biacore T200, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia) para evaluar los mecanismos de las interacciones biomoleculares en tiempo real entre VWF humano monómero purificado (analito) y proteínas receptoras tales como CLEC10A (ligando). Los instrumentos basados en SPR, tales como el Biacore T 200, utilizan un método óptico para monitorizar el cambio de índice de refracción próximo a la cara posterior de una superficie metálica sensora a la cual está inmovilizado un ligando. El analito se encuentra en la fase móvil que se hace pasar continuamente sobre el ligando inmovilizado. El evento de captura del analito por el ligando conduce a una acumulación de analito en la superficie y da como resultado un aumento en el índice de refracción, que se mide como una respuesta de SPR en tiempo real por detección de los cambios en la intensidad de la luz reflejada. La señal de SPR se expresa en RU y el cambio en la señal a lo largo del tiempo se presenta como un sensograma. Las respuestas de ruido de fondo respecto a una celdilla de flujo de referencia se sustraen de las respuestas experimentales. La magnitud del cambio en la señal SPR es directamente proporcional a la masa inmovilizada o capturada, y permite el ensayo de las constantes de fijación y el análisis cinético de los fenómenos de fijación en tiempo real y en un entorno exento de marcas (Biacore Handbook, 2008; Schasfoort & Tudos, 2008; Biacore Handbook, 2012).

Los experimentos de interacción se realizaron a una temperatura de la celdilla de flujo de +25 °C por aplicación de un tampón de ejecución que contenía HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl2 5 mM y 0,05% (peso/volumen) de Tween-20 a pH 7,4, que se utilizó también como tampón de dilución de la muestra. Las proteínas utilizadas se transfirieron a tampón de ejecución por columnas desaladoras PD-10 (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Alemania) antes de la aplicación. Los reactivos y las soluciones stock de tampón se adquirieron de GE Healthcare Biosciences (Uppsala, Suecia) y las soluciones tampón se esterilizaron por filtración (unidades de filtro Stericup de 0,22 µm, Millipore, Massachusetts, USA) antes de la utilización. El dominio extracelular de CLEC10A se adquirió de R&D Systems (Wiesbaden, Alemania). Adicionalmente, se utilizó albúmina humana como proteína de control (CSL Behring, Marburg, Alemania). CLEC10A se capturó en un Chip Sensor Series S C1 (carboximetilado plano) pretratado conforme a las instrucciones del fabricante. La investigación de CLEC10A se inició con un paso de preconcentración a fin de estimular la cantidad de proteína requerida para obtener un nivel deseado de inmovilización y para determinar el valor de pH óptimo para la inmovilización. Para una inmovilización eficiente, el valor de pH del tampón de inmovilización debe ser menor que el punto isoeléctrico del ligando. Así, para exploración del pH, se disolvió primeramente CLEC10A en WFI a una concentración de 1 mg/mL y se diluyó luego 1:50 en tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 4,0, 4,5, 5,0 and 5,5, respectivamente. El método se realizó conforme al asistente de exploración del pH de inmovilización en el software de control del instrumento Biacore aplicando un tiempo de contacto de 180 segundos y un caudal de 5 µL/min. Después del análisis, la superficie se regeneró con NaOH 50 mM antes de iniciar la inmovilización covalente.

Para el propósito de inmovilización, se diluyó la CLEC10A disuelta con tampón de acetato de sodio 10 mM que tenía el valor de pH óptimo (pH 5,0) a una concentración de 20 µg/mL. El ligando se inmovilizó covalentemente por grupos amino libres a la matriz de dextrano carboximetilada aplicando el kit de acoplamiento de amina conforme al protocolo del fabricante. El acoplamiento tiene lugar entre los grupos amino primarios del ligando y los grupos ácido carboxílico libres presentes en la superficie del chip después de su activación con una mezcla 1:1 de EDC 0,05 M y NHS 0,2 M durante 7 min. La inmovilización se realizó a un caudal de 10 µL/min a +25°C. Por último, se fijó como objetivo un

intervalo de densidad superficial entre 700 y 1.500 RU. Adicionalmente, se incluyó en el chip como superficie de referencia una celdilla de flujo en blanco sin proteína inmovilizada para los cambios masivos de desplazamiento y fijación inespecífica. Después de la inmovilización del ligando, ambas superficies del chip se bloquearon por etanolamina 1M-HCl (pH 8,5) durante 7 min y las interacciones inespecíficas no covalentes formadas potencialmente durante el proceso de inmovilización se eliminaron por lavado con NaOH 10 mM durante 10 segundos 3 veces a un caudal de 25 µL/min. La línea base de la SPR se acondicionó realizando 5 ciclos de inicio de la operación con tampón de ejecución en cada caso.

Se prepararon concentraciones crecientes de VWF monómero como una serie de dilución seriada al doble en tampón de ejecución y se inyectaron sucesivamente a través de la superficie del chip a 25 µl/min a fin de caracterizar la interacción proteína-ligando. Las concentraciones de monómeros VWF oscilaban entre 4000 y 31,25 nM y se calcularon basándose en el peso molecular del VWF monómero. Todas las muestras se diseñaron de modo que contuvieran composiciones tampón similares debido a la alta sensibilidad del sistema SPR a los cambios en la composición del tampón. El caudal relativamente alto se eligió para evitar la refijación potencial debida a limitaciones de transferencia de masa. Los ciclos de análisis de la interacción estaban constituidos por una fase de inyección de muestra de 5 min. En esta fase de asociación, el VWF se fijaba a la CLEC10A inmovilizada en la superficie, y aumentaba la masa superficial. Esta fase iba seguida por una fase de disociación de 17 min en tampón de ejecución. En la fase de disociación, la muestra se reemplazaba por tampón de ejecución y el VWF disociado se retiraba de la superficie, dando como resultado una masa superficial disminuida. Todas las muestras se ensayaron como determinación repetida. Tanto la superficie del chip como la superficie de control se regeneraron con un pulso de 10 segundos de NaOH 10 mM entre cada ejecución a fin de retirar el VWF fijado de la CLEC10A inmovilizada en la superficie, un paso que se repitió 3 veces antes del comienzo de un paso de lavado final de 2 min con tampón de ejecución y la ejecución siguiente. Aunque los datos cinéticos se analizaron utilizando el Software de Evaluación Biacore T200 Version 1. 0 (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia), el conjunto de los datos se utilizó sólo para propósito de información.

La SPR se utilizó predominantemente como detector de masa. Una interacción de VWF con CLEC10A se detectaba por un aumento de masa acumulativo y la fijación específica se identificó sustrayendo la respuesta de fijación registrada de la superficie de control, seguido por sustracción de un valor medio de las inyecciones en blanco de tampón. Se posicionó un punto instantáneo 20 segundos después del final de la inyección de la muestra y se evaluó como representativo de una interacción estable proteína-ligando, que era el punto de interés. Así, se utilizó este punto para la evaluación y cálculo de las interacciones biomoleculares entre VWF y CLEC10A. Adicionalmente, el ensayo se realizó al menos por duplicado y la respuesta se calculó con relación a la línea base en cada caso. Además de la evaluación general de la interacción VWF-CLEC10A, se determinaron las constantes de afinidad (R50%), que representaban la respuesta de la concentración total de VWF que podría ocupar 50% de CLEC10A. Las constantes de afinidad se utilizaron para estimación de la afinidad de fijación por aplicación del punto de reporte definido y se derivaron por ajuste no lineal de la curva global utilizando el ajuste de afinidad en estado estacionario prefijado por el software. Además, se calcularon las constantes de tasa de disociación (off-rate) por ajuste de la fase de disociación sola. Se estableció un modelo de disociación adecuado (Biacore Training Courses, 2008) y se utilizó para el cálculo el punto de reporte definido anteriormente.

Resultados

Para la caracterización de CLEC10A por SPR, VWF exhibía una fijación fuerte de una manera dependiente de la dosis, como se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 2: Interacción de VWF Humano Monómero con CLEC10A Humana Recombinante y las Proteínas CLEC10A Ortólogas de Ratón (MGL1 y MGL2)

Materiales y Métodos

CLEC10A, MGL1 and MGL2 se inmovilizaron en un Chip Sensor Series S CM3 (valor de pH para la inmovilización: pH 5,0 para CLEC10A y MGL1; pH 5,5 para MGL2), respectivamente, como se describe en el Ejemplo 1. La inmovilización de las proteínas receptoras se realizó por acoplamiento de amina, pero se fijó como objetivo una densidad superficial de 6. 000 (±500) RU. El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

Las interacciones de fijación se investigaron por análisis SPR. Los resultados presentados en la Tabla 1 y en las Figuras 2 y 3 demuestran claramente que los monómeros de VWF humano purificado se fijan a CLEC10A humana y a ambas proteínas receptoras murinas de una manera dependiente de la dosis in vitro. En general, se observaron características de fijación similares para las tres proteínas receptoras.

Se estimaron las constantes de afinidad (R50%) para la fijación de VWF al receptor. Adicionalmente, se calcularon las constantes de tasa de disociación (off-rates) por ajuste de la fase de disociación sola. Para el cálculo se utilizó la respuesta de fijación representativa para una interacción estable proteína-ligando (20 segundos después del final de

la inyección de la muestra). Se estimaron afinidades menores de VWF humano monómero para las proteínas receptoras de ratón MGL1 y MGL2, en comparación con la fijación de VWF a CLEC10A humana.

Tabla 1:

Proteína receptora inmovilizada	Monómeros de VWF purificados como analito en la fase móvil	
	$R_{50\%}$ [µM]	Tasa de Disociación (Off-rate) [10^{-4} s^{-1}]
CLEC10A	1,47	5,10
MGL1	3,43	4,06
MGL2	3,00	3,81

Ejemplo 3: Inhibición de la Fijación de VWF a MGL2 en Presencia de un Anticuerpo Neutralizante Anti-MGL1/2

Materiales y Métodos

El efecto inhibidor de un anticuerpo policlonal de cabra anti-MGL 1/2 (Prod. No. AF4297, R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) sobre la fijación de VWF se investigó por análisis SPR. Los anticuerpos liofilizados se disolvieron en tampón de ejecución a una concentración de 200 µg/mL. MGL1 y MGL2 se inmovilizaron en un Chip Sensor Series S CM3, respectivamente. La inmovilización de las proteínas receptoras se realizó por acoplamiento de amina como se ha descrito anteriormente. Se fijó como objetivo una densidad superficial de 6. 000(±500) RU. El tampón de ejecución y el anticuerpo anti-MGL1/2 se inyectaron durante 12 min, respectivamente, seguidos por una inyección dual de VWF monómero (2 µM) durante 5 min y una fase de disociación final de 8 min. El análisis SPR se realizó a un caudal de 20 µL/min a +25°C.

Resultados

Por ejemplo (véase Figura 4), el anti-MGL1/2 neutralizante exhibía una fijación fuerte a MGL2 inmovilizada (véanse las Figuras 4 A y 4 B), dando como resultado un aumento de masa. El VWF utilizado como analito no se fijaba a la proteína receptora inmovilizada, dado que el anticuerpo neutralizante bloqueaba el dominio de fijación respectivo del receptor. Como consecuencia, no podía detectarse la fijación de VWF. En contraste, VWF se fijaba fuertemente a MGL2 inmovilizada en ausencia del anticuerpo neutralizante como se demostraba por la muestra de control que utilizó tampón de ejecución (véanse Figuras 4A y 4C).

En conclusión, el efecto bloqueante del receptor del anticuerpo policlonal se comprobó claramente por análisis SPR. Como resultado, el análisis por SPR reveló que el anticuerpo bloqueaba completamente la interacción de VWF con MGL1 y MGL2 inmovilizadas, respectivamente. Como consecuencia, ambos anticuerpos fueron evaluados cualitativamente como aplicables para bloquear específicamente MGL1 y MGL2.

Ejemplo 4: Se utilizó un Anticuerpo Inhibidor para Bloquear Específicamente las Proteínas Receptoras Ortólogas de Ratón de CLEC10A Humana *in vivo*, Dando como Resultado un Aclaramiento *in vivo* Reducido de VWF en los Ratones

En el ratón existen las dos proteínas receptoras ortólogas de CLEC10A MGL1 y MGL2. Se aplicó un anticuerpo policlonal de cabra anti-MGL 1/2 (Prod. No. AF4297, R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) para bloqueo del receptor *in vivo.* Además, se utilizó como tratamiento de control un anticuerpo inespecífico (Prod. No. I5256, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) purificado a partir de suero normal de cabra acumulado.

Ratones deficientes en VWF recibieron por vía intravenosa 8 mg del anticuerpo inhibidor específico por kg de peso corporal para estudiar el efecto de los receptores MGL1 y MGL2 sobre el aclaramiento de VWF *in vivo*. Previamente, se disolvió el anticuerpo liofilizado en solución isotónica de NaCl (volumen de aplicación 5 ml/kg de peso corporal). Como tratamiento de control se utilizó el anticuerpo inespecífico. Después de 10 min, los ratones recibieron pdVWF humano (200 UI/kg de peso corporal) como inyección intravenosa simple (volumen de aplicación 5 ml/kg de peso corporal). El diseño del estudio incluía 2 grupos de 2 ratones cada uno. Se recogieron muestras de sangre después de la administración de VWF (grupo 1: toma de muestras a los 5 y 120 min; grupo 2: toma de muestras a los 60 y 240 min); las muestras se procesaron a muestras de plasma y se analizaron luego por ELISA VWF:Ag. Los datos resultantes se presentan en la Figura 5. Una vista de conjunto del análisis estadístico se da en la Tabla 2.

El análisis de los datos PK reveló que el tratamiento con el anticuerpo anti-MGL 1/2 de los ratones deficientes en VWF revelaba un efecto inhibidor sobre el aclaramiento de VWF humano, cuando se comparaba con el grupo que recibió el anticuerpo de control. En presencia del anticuerpo inhibidor anti-MGL1/2, el AUC era aproximadamente 1,7 veces mayor en comparación con el tratamiento de control, y la tasa de aclaramiento de VWF del plasma era aproximadamente 1,7 veces menor. En conclusión, se encontró que MGL1 y MGL2 juegan un papel importante en el aclaramiento de VWF *in vivo* y podrían ser un mediador esencial de la absorción de VWF.

En resumen, se utilizó un anticuerpo inhibidor para bloquear específicamente los dominios de reconocimiento de carbohidratos de las proteínas receptoras ortólogas de ratón de CLEC10A humana *in vivo*, a fin de evaluar ulteriormente la implicación de las proteínas receptoras respectivas en el aclaramiento de VWF. Un análisis de los datos PK reveló que el tratamiento con el anticuerpo anti-MGL1/2 de ratones deficientes en VWF demostraba un efecto inhibidor sobre el aclaramiento de VWF humano, cuando se comparaba con el grupo que recibió el anticuerpo de control inespecífico. Los anticuerpos dirigidos contra MGL1/MGL2 inhibían la degradación de VWF humano en un grado significativo, indicando que MGL1/MGL2 contribuye a la fijación de VWF, y que el bloqueo específico de los receptores prevenía la absorción de VWF *in vivo*. Estos datos sugieren que VWF se incluye por endocitosis por un mecanismo mediado por receptores, y confirman la implicación de CLEC10A humana en la absorción de VWF.

Tabla 2: Análisis estadístico del aclaramiento *in vivo* de VWF humano en los ratones deficientes en VWF en presencia de un anticuerpo neutralizante de la función receptora de MGL1 y MGL2

Para evaluar el aclaramiento de VWF en presencia del anticuerpo anti-MGL 1/2, se calcularon los datos PK. En presencia del anticuerpo inhibidor anti-MGL 1/2, disminuía el aclaramiento de VWF					
Tratamiento	**C_{max}** [UI/mL]	**Recuperación *in vivo*** [%]	**AUC $_{0\text{-}240min}$** [UI*h/mL]	**AUC, valor relativo***	**Aclaramiento del plasma** [mL/kg/h]
pdVWF + anticuerpo de control	3,03	61	3,03	1,0*	66
pdVWF + anticuerpo anti-MGL 1/2	4,47	89	5,14	1,7	39
*Para el cálculo, el AUC del tratamiento de control con solución isotónica de NaCl se definió como 100%, y por tanto daba como resultado un factor 1,0.					

Ejemplo 5: Generación de Anticuerpos Bloqueantes de CLEC10A Humana

Para un experto en la técnica existen varios métodos de generación de anticuerpos que podrían utilizarse en el descubrimiento de anticuerpos bloqueantes para CLEC10A humana recombinante o asociada a membrana. En este ejemplo se utilizan tecnologías de anticuerpos de presentación de fago con CLEC10A recombinante para la generación de anticuerpos y la selección funcional preliminar. La confirmación de la actividad bloqueante de los anticuerpos se realiza utilizando ensayos de internalización basados en células o estudios farmacocinéticos *in vivo* en modelos apropiados.

Se utiliza una biblioteca de presentación de fagos basada en Fab humano (Dyax Corp. Cambridge, MA) para seleccionar contra CLEC10A humana biotinilada utilizando métodos descritos anteriormente (WO2013014092 A1). Después de tres rondas de lavado en batea, se seleccionan clones de fago individuales múltiples de cada ronda de lavado en batea y se exploran en cuanto a fijación específica a CLEC10A humana utilizando ELISA Fab-fago. Para cualesquiera clones de fago específicos de CLEC10A, se amplifica la región Fab utilizando PCR y se determinan las secuencias de región variable (cadena pesada y ligera) por secuenciación de nucleótidos.

Para evaluación funcional ulterior, se modifican de nuevo por ingeniería genética anticuerpos Fab específicos de CLEC10A en anticuerpos IgG4 humanos intactos y se expresan utilizando un sistema de expresión de mamífero como se ha descrito previamente (WO2013014092 A1). La fijación específica de estos anticuerpos IgG a CLEC10A se confirma por ELISA. Se identifican un panel de anticuerpos IgG singulares con especificidad de fijación para CLEC10A humana.

Selección de anticuerpos específicos de CLEC10A para actividad de bloqueo de la función

La actividad de bloqueo de la función de los anticuerpos IgG específicos de CLEC10A se evalúa por su capacidad para inhibir la fijación de βGalNAcPAA o vWF a CLEC10A por ELISA. Los anticuerpos que muestran actividad bloqueante en este ensayo se caracterizan luego adicionalmente por su capacidad para modular la internalización de VWF conjugado con fluoróforos por los macrófagos activados utilizando citometría de flujo.

Dado que cualesquiera anticuerpos bloqueantes de la función identificados por este ejemplo son de naturaleza totalmente humana, los mismos son fácilmente aplicables para uso terapéutico en humanos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL Behring Recombinant Facility AG

<120> Compuestos para aumentar la semi-vida del factor von Willebrand

<130> A242

<150> EP2015158088. 3
<151> 2015-03-06

<160> 2

<170> PatentIn version 3. 5

<210> 1
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA
<222> (35). . (35)
<223> Xaa es Cys o Arg

<220>
<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA
<222> (73). . (73)
<223> Xaa es Arg o Lys

<220>
<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA
<222> (100). . (100)
<223> Xaa es Thr o Met

<220>
<221> CARACTERÍSTICA DIVERSA
<222> (203). . (203)
<223> Xaa es Ala o Gly

<400> 1

Met Thr Arg Thr Tyr Glu Asn Phe Gln Tyr Leu Glu Asn Lys Val Lys
1 5 10 15

Val Gln Gly Phe Lys Asn Gly Pro Leu Pro Leu Gln Ser Leu Leu Gln
20 25 30

Arg Leu Xaa Ser Gly Pro Cys His Leu Leu Leu Ser Leu Gly Leu Gly
35 40 45

Leu Leu Leu Leu Val Ile Ile Cys Val Val Gly Phe Gln Asn Ser Lys
50 55 60

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

```
Ser Asn Thr Val Ala Glu Ile Gln Ala Leu Thr Ser Gln Gly Ser Ser
                85                  90                  95

Leu Glu Glu Xaa Ile Ala Ser Leu Lys Ala Glu Val Glu Gly Phe Lys
            100                 105                 110

Gln Glu Arg Gln Ala Gly Val Ser Glu Leu Gln Glu His Thr Thr Gln
        115                 120                 125

Lys Ala His Leu Gly His Cys Pro His Cys Pro Ser Val Cys Val Pro
    130                 135                 140

Val His Ser Glu Met Leu Leu Arg Val Gln Gln Leu Val Gln Asp Leu
145                 150                 155                 160

Lys Lys Leu Thr Cys Gln Val Ala Thr Leu Asn Asn Asn Ala Ser Thr
                165                 170                 175

Glu Gly Thr Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His Gln Asp Ser Cys
            180                 185                 190

Tyr Trp Phe Ser His Ser Gly Met Ser Trp Xaa Glu Ala Glu Lys Tyr
        195                 200                 205

Cys Gln Leu Lys Asn Ala His Leu Val Val Ile Asn Ser Arg Glu Glu
    210                 215                 220

Gln Asn Phe Val Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Ala Tyr Thr Trp Met Gly
225                 230                 235                 240

Leu Ser Asp Pro Glu Gly Ala Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr
                245                 250                 255

Ala Thr Gly Phe Gln Asn Trp Lys Pro Gly Gln Pro Asp Asp Trp Gln
            260                 265                 270

Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His Phe His Pro Asp
        275                 280                 285

Gly Arg Trp Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr His Trp Val Cys
    290                 295                 300

Glu Ala Gly Leu Gly Gln Thr Ser Gln Glu Ser His
305                 310                 315
```

<210> 2
<211> 316

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Thr Arg Thr Tyr Glu Asn Phe Gln Tyr Leu Glu Asn Lys Val Lys
1               5                  10                  15

Val Gln Gly Phe Lys Asn Gly Pro Leu Pro Leu Gln Ser Leu Leu Gln
            20                  25                  30

Arg Leu Cys Ser Gly Pro Cys His Leu Leu Leu Ser Leu Gly Leu Gly
        35                  40                  45

Leu Leu Leu Leu Val Ile Ile Cys Val Val Gly Phe Gln Asn Ser Lys
    50                  55                  60

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

Ser Asn Thr Val Ala Glu Ile Gln Ala Leu Thr Ser Gln Gly Ser Ser
                85                  90                  95

Leu Glu Glu Thr Ile Ala Ser Leu Lys Ala Glu Val Glu Gly Phe Lys
            100                 105                 110

Gln Glu Arg Gln Ala Gly Val Ser Glu Leu Gln Glu His Thr Thr Gln
        115                 120                 125

Lys Ala His Leu Gly His Cys Pro His Cys Pro Ser Val Cys Val Pro
    130                 135                 140

Val His Ser Glu Met Leu Leu Arg Val Gln Gln Leu Val Gln Asp Leu
145                 150                 155                 160

Lys Lys Leu Thr Cys Gln Val Ala Thr Leu Asn Asn Asn Ala Ser Thr
                165                 170                 175

Glu Gly Thr Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His Gln Asp Ser Cys
            180                 185                 190

Tyr Trp Phe Ser His Ser Gly Met Ser Trp Ala Glu Ala Glu Lys Tyr
        195                 200                 205

Cys Gln Leu Lys Asn Ala His Leu Val Val Ile Asn Ser Arg Glu Glu
    210                 215                 220

Gln Asn Phe Val Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Ala Tyr Thr Trp Met Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Leu Ser Asp Pro Glu Gly Ala Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr
               245                 250                 255

Ala Thr Gly Phe Gln Asn Trp Lys Pro Gly Gln Pro Asp Asp Trp Gln
            260                 265                 270

Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His Phe His Pro Asp
        275                 280                 285

Gly Arg Trp Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr His Trp Val Cys
    290                 295                 300

Glu Ala Gly Leu Gly Gln Thr Ser Gln Glu Ser His
305                 310                 315
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo capaz de fijarse a la proteína receptora humana CLEC10A para uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, en donde dicho anticuerpo es capaz de inhibir la fijación del factor von Willebrand a CLEC10A y dicho trastorno de la coagulación de la sangre es hemofilia A o enfermedad de von Willebrand.

2. El anticuerpo para uso conforme a la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se fija específicamente a CLEC10A.

3. El anticuerpo para uso conforme a la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

4. El anticuerpo para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha CLEC10A tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1.

5. El anticuerpo para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la semi-vida del factor von Willebrand se aumenta por el tratamiento.

6. El anticuerpo para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la semi-vida del Factor VIII se aumenta por el tratamiento.

7. El anticuerpo para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tratamiento comprende adicionalmente administrar un polipéptido seleccionado del grupo constituido por Factor VIII, factor von Willebrand y combinaciones de los mismos.

8. El anticuerpo para uso conforme a la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo y dicho polipéptido se administran por separado.

9. Un kit farmacéutico que comprende (i) un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y (ii) un polipéptido seleccionado del grupo constituido por Factor VIII, factor von Willebrand y combinaciones de los mismos.

10. El kit farmacéutico de la reivindicación 9, en donde dicho anticuerpo y dicho polipéptido están contenidos en composiciones separadas.

11. Un kit farmacéutico que comprende (i) un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y (ii) un polipéptido seleccionado del grupo constituido por Factor VIII, factor von Willebrand y combinaciones de los mismos, para uso simultáneo, separado o sucesivo en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre.

12. El anticuerpo para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en la reducción del aclaramiento del factor von Willebrand.

13. El anticuerpo para uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para aumento de la semi-vida del Factor VIII.

Figura 1

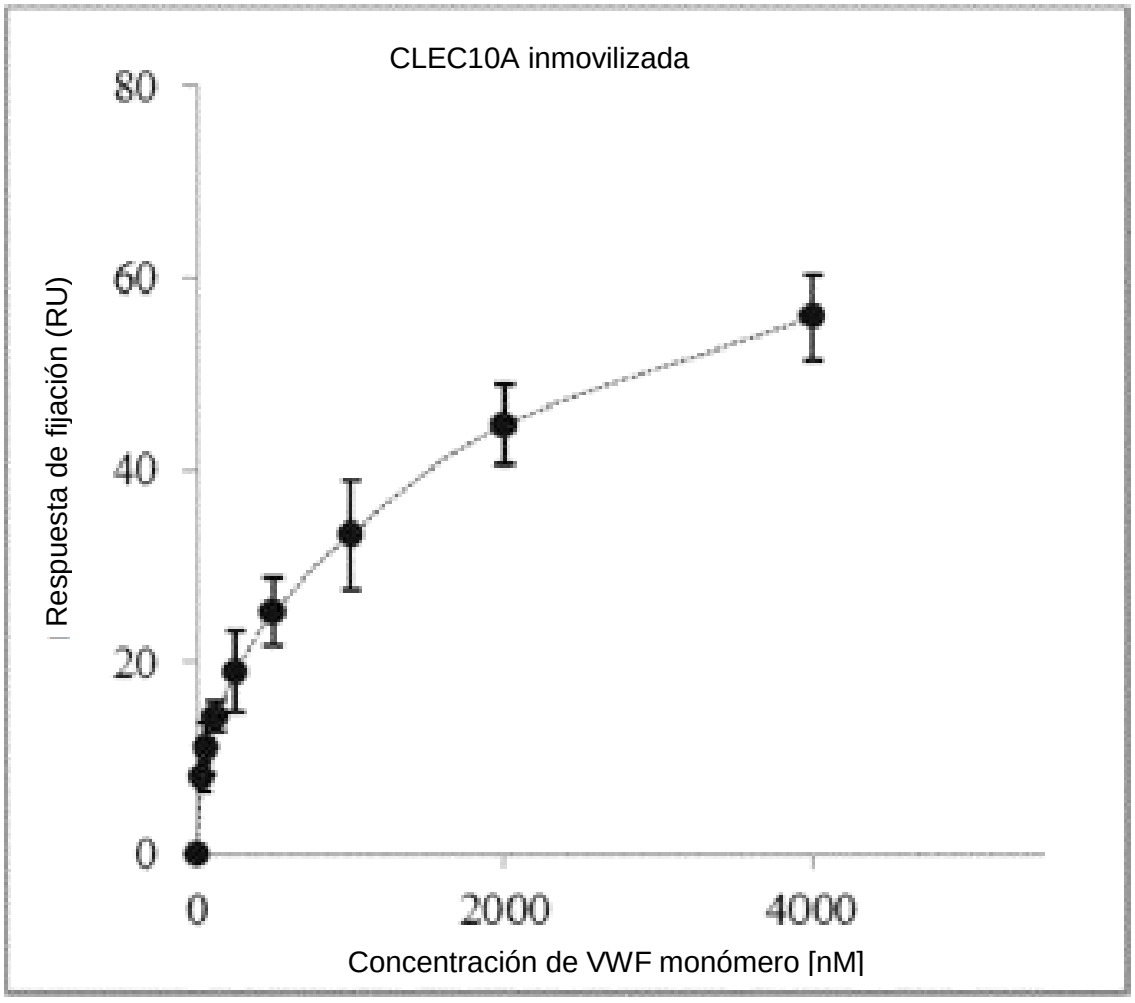

CLEC10A inmovilizada
Respuesta de fijación (RU)
80
60
40
20
0
0
2000
4000
Concentración de VWF monómero [nM]

Figura 2

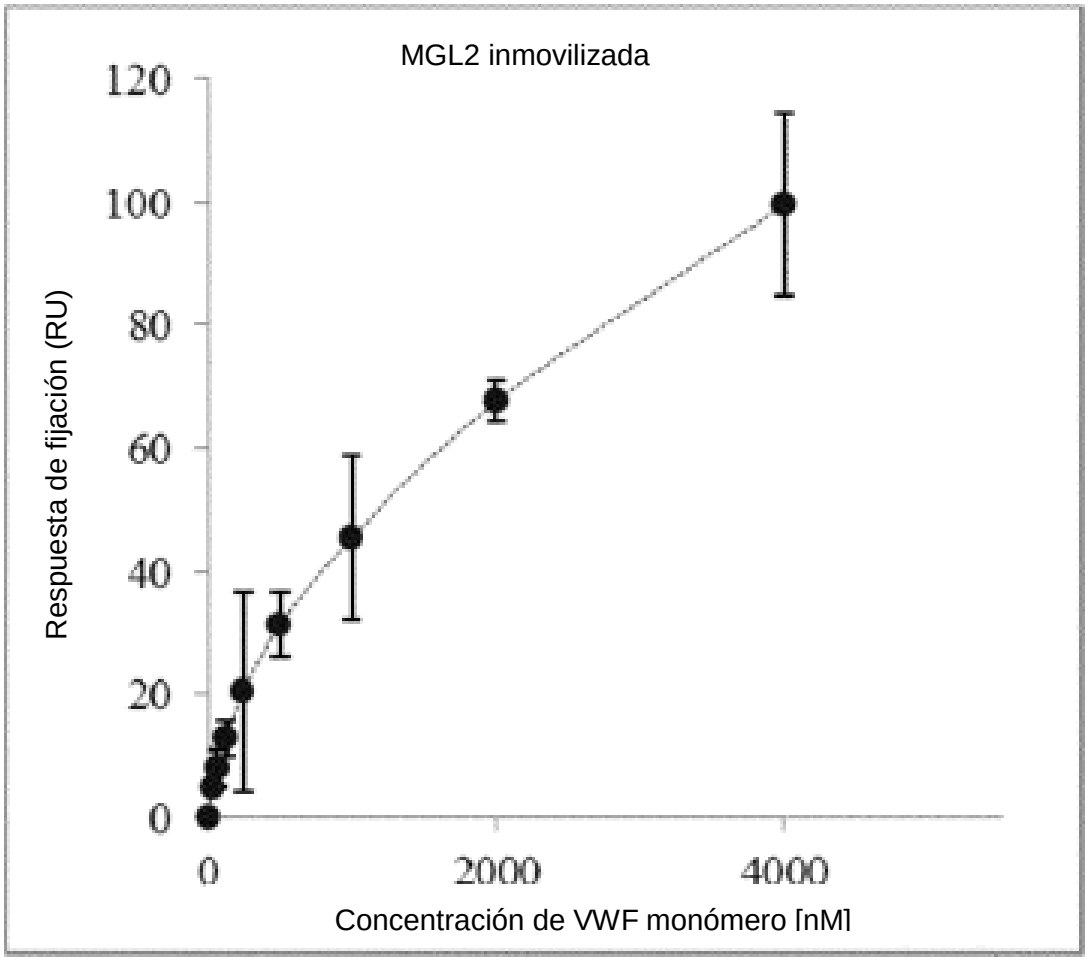

MGL2 inmovilizada
Respuesta de fijación (RU)
120
100
80
60
40
20
0
0
2000
4000
Concentración de VWF monómero [nM]

Figura 3

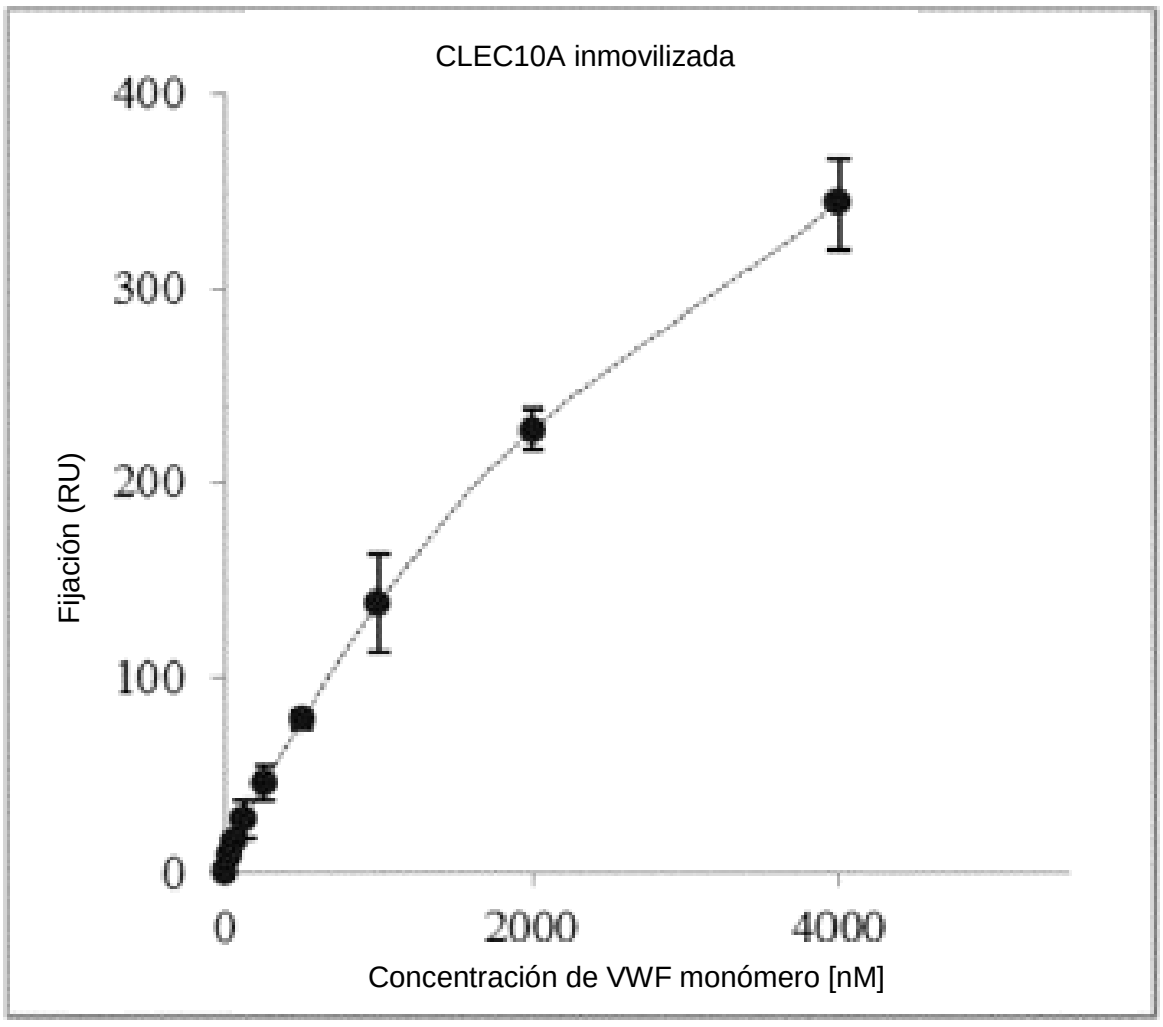

CLEC10A inmovilizada
400
300
200
100
0
Fijación (RU)
0
2000
4000
Concentración de VWF monómero [nM]

Figura 4A

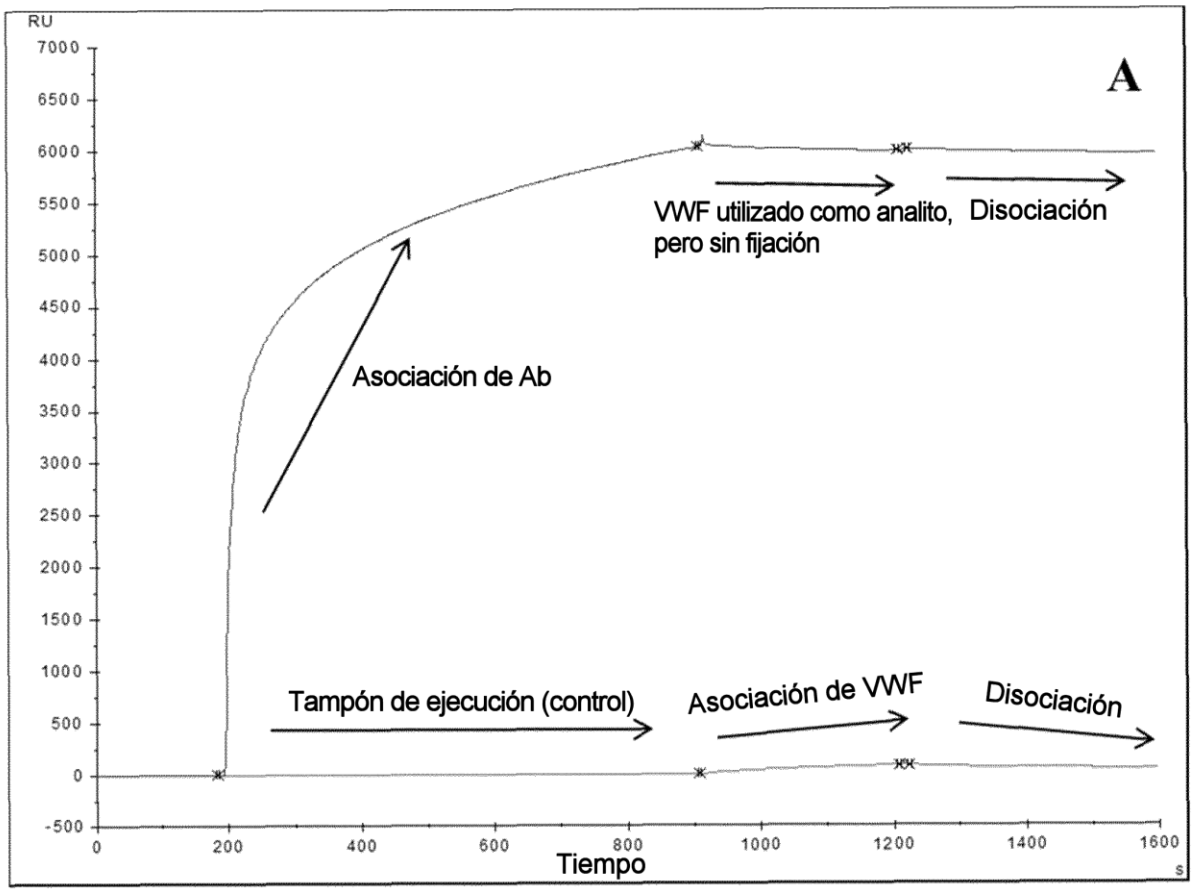

RU
7000
6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
Tiempo
s
A
VWF utilizado como analito, pero sin fijación
Disociación
Asociación de Ab
Tampón de ejecución (control)
Asociación de VWF
Disociación

Figura 4B

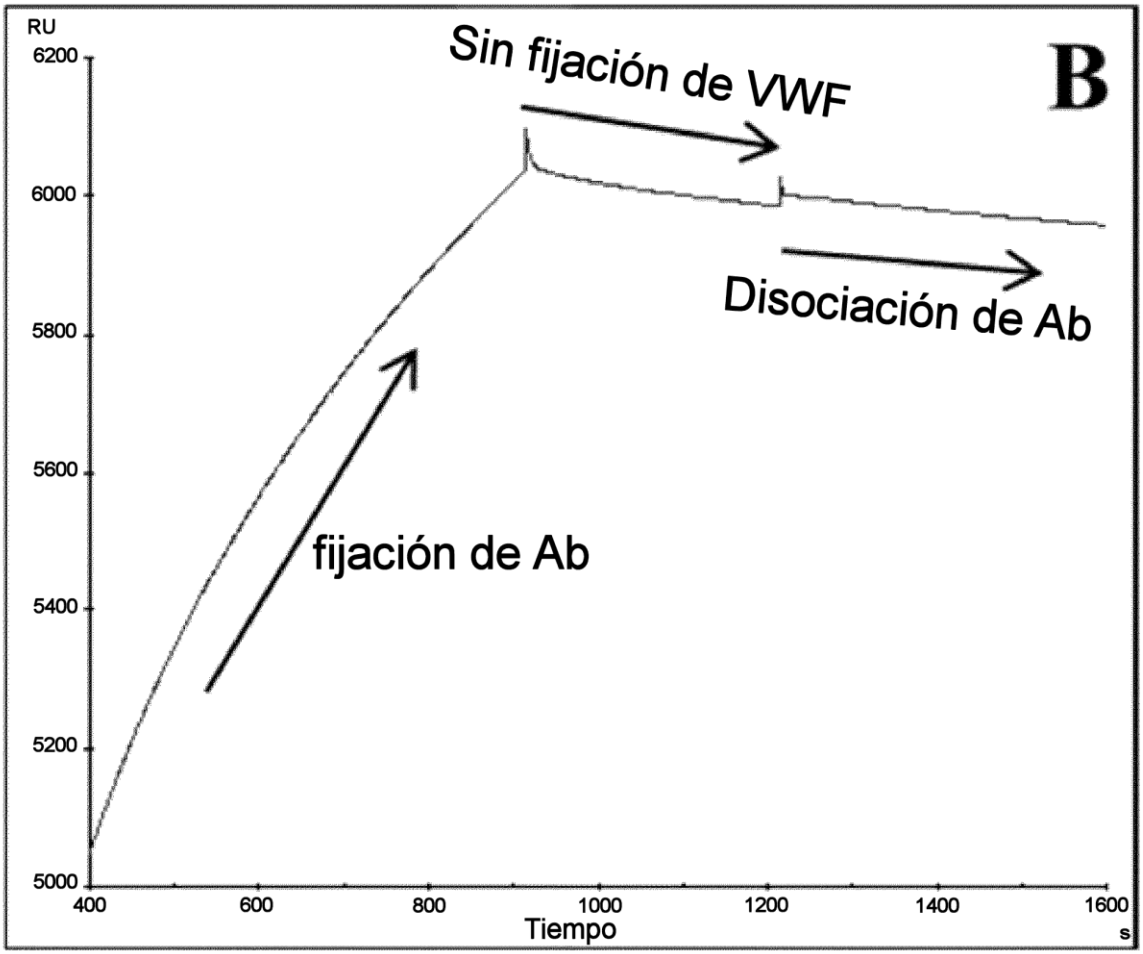

RU
6200
6000
5800
5600
5400
5200
5000
400
600
800
1000
1200
1400
1600
Tiempo
s
Sin fijación de VWF
B
Disociación de Ab
fijación de Ab

Figura 4C

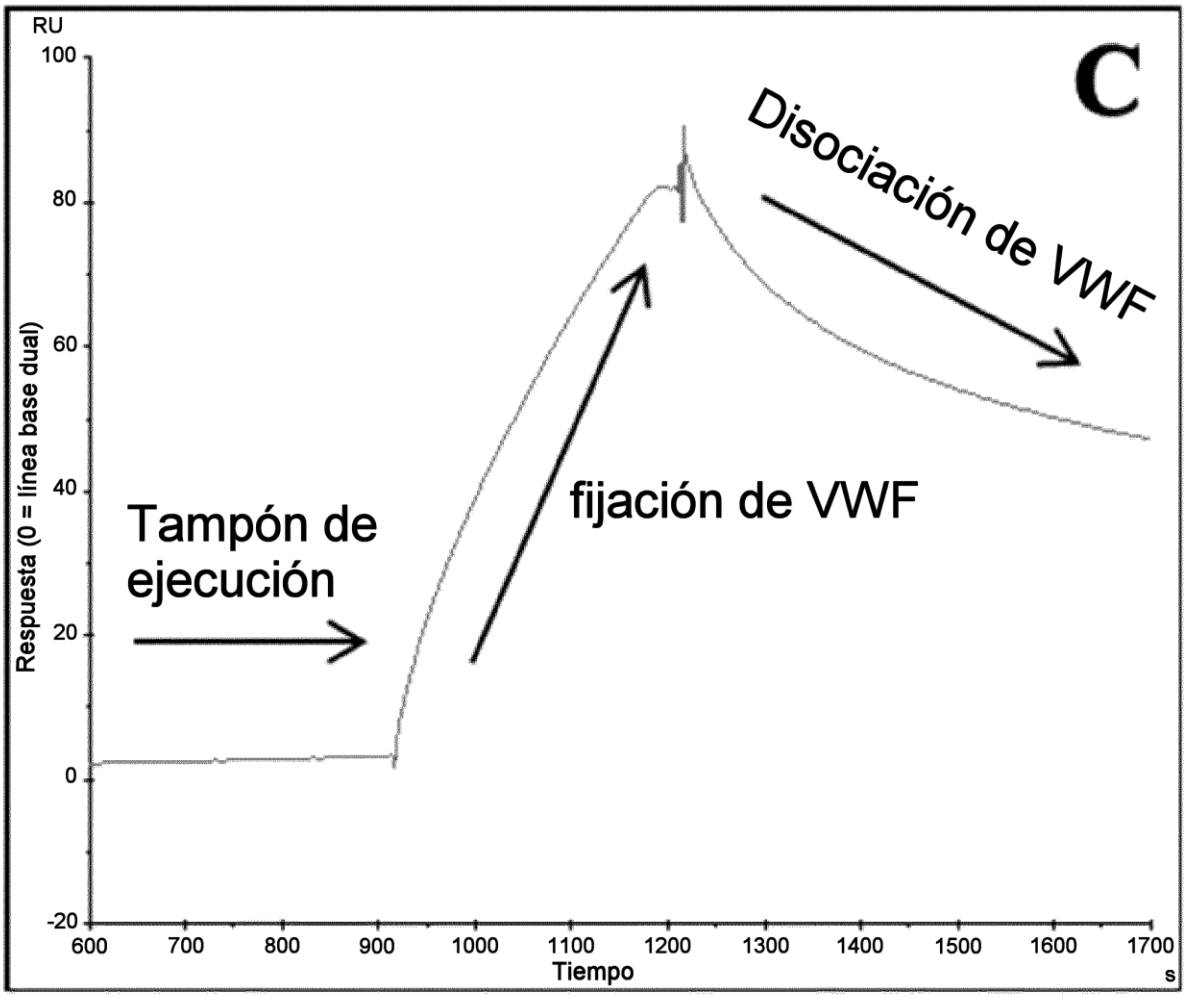
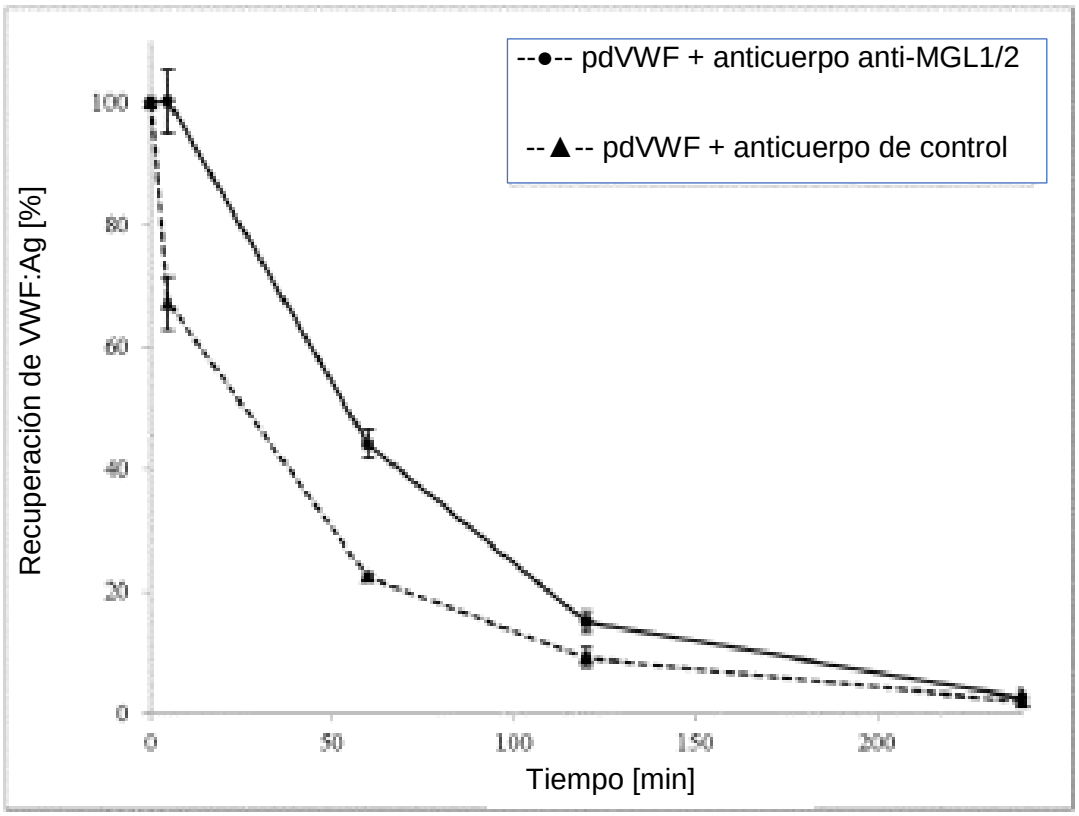

C
RU
100
80
60
40
20
0
-20
Respuesta (0 = línea base dual)
Disociación de VWF
fijación de VWF
Tampón de ejecución
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
Tiempo
s

Figura 5


--●-- pdVWF + anticuerpo anti-MGL1/2
--▲-- pdVWF + anticuerpo de control
Recuperación de VWF:Ag [%]
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
Tiempo [min]