



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 004**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01) **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) **A61P 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02748417 .9**
96 Fecha de presentación : **26.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1412388**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **Anticuerpos humanizados derivados de DD-3B6/22, específicos para el fragmento de dímero D de fibrina.**

30 Prioridad: **26.06.2001 US 301154 P**
27.06.2001 US 300947 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2011

73 Titular/es: **Agen Biomedical Limited**
C/- Nicholas Weston Ground Floor 156 Collins
Street
Melbourne Vic 3000, AU

72 Inventor/es: **Carr, Francis J. y**
Hamilton, Anita A.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 365 004 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos Humanizados Derivados de DD-3B6/22, Específicos Para el Fragmento de Dímero D de Fibrina

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona de manera general con moléculas portadoras derivadas de una especie o cepa de animal o ave y que son sustancialmente no inmunogénicas que se exponen a un sistema inmune de una especie o cepa de otra criatura animal o ave. Más particularmente, la presente invención proporciona moléculas inmunoreactivas des inmunizadas y aún más particularmente anticuerpos des inmunizados para uso en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

- 10 Los detalles bibliográficos de las publicaciones denominadas en esta especificación se recolectan al final de la descripción.

No se hace referencia a ninguna técnica anterior en esta especificación, y no se debe tomar como, un conocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

- 15 El fibrinógeno es una molécula de proteína grande que circula normalmente en el plasma sanguíneo en un estado disuelto. En la presencia de trombina, las moléculas de fibrinógeno forman polímeros como hebras largas o redes denominadas fibrina, que es el ingrediente primario de los coágulos de sangre.

- 20 Luego de la digestión con plasmina, el fibrinógeno forma fragmentos designados A-E. Los fragmentos D y E son los fragmentos predominantes y existe aproximadamente dos veces tanto D como de E. El fibrinógeno tiene una forma trinodular en donde el fragmento E es un componente central y el fragmento D es un componente terminal.

- 25 Las digestiones de plasmina de fibrina y fibrinógeno se pueden diferenciar una de la otra utilizando electroforesis de gel de poli acrilamida (PAGE). La reticulación de fibrina con el Factor XIIIa forma los dímeros del fragmento D denominados dímeros D. El Factor XIIIa es una enzima que introduce enlaces covalentes entre monómeros adyacentes en fibrina (Budzynski et al., Blood 54(4): 794-804, 1979). El Factor XIIIa se activa mediante la remoción catalizada de trombina de un péptido de un precursor en plasma y en plaquetas de sangre. El dímero D es una molécula de aproximadamente 189,000 daltons que consiste esencialmente de dos grupos funcionales del fragmento D derivados de diferentes moléculas de fibrina unidas covalentemente mediante enlaces reticulados entre los remanentes de cadena γ y de fibrinógeno. El fibrinógeno en sí mismo comprende seis cadenas con dos copias de una cadena α , β , y γ .

- 30 Otro complejo (DD)E se forma por la degradación de plasmina de fibrina humana reticulada y comprende una combinación de dos fragmentos D y fragmento E.

Otros derivados reticulados se describen por Graeff and Halfer (Graeff and Halfer, "Detection and Relevance of Cross-Linked Fibrin Derivatives in Blood", Seminars in Thrombosis and Hemostasis 8(1), 1982) y incluyen derivados reticulados de alto peso molecular tal como DY, YY, XD, XY, DXD y YXD.

- 35 La homeostasis normal o la coagulación de la sangre involucran mantener constituyentes intravasculares en una fase líquida o suspensión mientras que permite concomitantemente la deposición local de componentes de sangre de fase sólida en áreas de daño de vaso. En la salud, se asume, pero nunca demuestra experimentalmente, que existe un balance entre un depósito intravascular de bajo grado de fibrina y su remoción mediante fibrinólisis o fagocitosis celular.

- 40 Las observaciones clínicas tempranas revelan que algunos de varios paciente desarrollan signos de hemorragia y aparición masiva de moretones y tiene tiempos de coagulación prolongados y trombocitopenia. En post-mortem, en algunos casos, se demuestran trombos de fibrina en la microvasculatura. La naturaleza difusa de estos trombos da surgimiento a la coagulación intravascular diseminada (DIC) también conocido como coagulopatía de consumo. Posteriormente, las trombinas se asocian con condiciones tal como trombosis de vena profunda (DVT) y embolismo pulmonar (PE).
- 45

Las condiciones tal como DIC, DVT y PE involucran la activación del sistema de coagulación que resulta en el consumo de plaqueta, la generación de trombina, depósito de fibrina y fibrinólisis secundaria. El efecto biológico neto de este proceso refleja un balance entre el depósito de fibrina y la remoción de fibrina. Las manifestaciones clínicas

resultantes pueden ser hemorragia, cuando predomina el agotamiento de los factores predominantes, o el daño de tejido isquémico, debido a los efectos de oclusión vascular entre otras condiciones.

5 Se han reportado DIC, DVT y PE como un fenómeno secundario una amplia variedad de trastornos, particularmente aquellos acompañados por una combinación de choque, acidosis e hipoxemia. Las asociaciones clínicas bien reconocidas son sepsis, trauma principal, malignidad y trastornos obstétricos. Recientemente, se ha reconocido el DVT como un problema particular durante el viaje de aire prolongado u otra inmovilidad prolongada. En cualquier evento, la activación de la secuencia de coagulación resulta en el consumo de la proteína de coagulación y las plaquetas, que conduce a depósitos de fibrina en la microcirculación.

10 De forma ideal, un diagnóstico definitivo de condiciones tal como DIC, DVT y PE requiere la demostración directa del depósito de fibrina difuso. La dificultad práctica para obtener múltiples evidencias de biopsias directas para diferenciar entre la formación de fibrina localizada y generalizada ha conducido al desarrollo de las pruebas indirectas que se sustituyen como puntos finales de diagnóstico. Sin embargo, estas pruebas no son específicas para el síndrome de depósito de fibrina intravascular. Su especificidad se reduce adicionalmente mediante la acción de otras enzimas que aunque no son capaces de convertir el fibrinógeno a fibrina pueden originar alteraciones
15 similares a la trombina en los otros factores de coagulación involucrados en la trombosis. Todas las pruebas indirectas se basan en el principio que la trombina es solo la enzima (venenos de serpiente excluidos) capaz de convertir el fibrinógeno a fibrina en los mamíferos.

También, aparte de las pruebas de paracoagulación que detectan la presencia de circular complejos de monómero de fibrina solubles, ninguna de las pruebas de trombina más específicas está disponible fácilmente o es útil para la aplicación clínica inmediata en el diagnóstico de estas condiciones asociadas con fibrina. Estas pruebas incluyen la prueba FPA (fibrinopéptido A) en donde se mide FPA mediante un procedimiento RIA específico, ensayos de monómero de fibrina, cromatografías de exclusión de gel de fibrinógeno y pruebas para FPB (fibrinopéptido B) o FPB de trombina incrementada.
20

Las pruebas sin especificidad bioquímica para la acción de trombina incluyen las pruebas de tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina (A PTT) y el tiempo de coagulación trombina (TCT). Aunque frecuentemente utilizado en la práctica, se debe reconocer que la información obtenida de estas pruebas no es específica en naturaleza, que actúa como una medición de un agotamiento del factor de coagulación independiente de la etiología.
25

Se ha encontrado que los ensayos de factor de coagulación son relativamente no específicos y estos incluyen ensayos para los cofactores V y VIII así como también pruebas para los niveles de fibrinógeno.

30 Las pruebas para los productos de degradación de fibrina-fibrinógeno no se han aprobado por ser específicos para la acción de plasmina en fibrina y pueden proporcionar resultados positivos en donde ha habido fibrinólisis sin la acción de trombina anterior en la molécula de fibrinógeno. Estas pruebas incluyen los fragmentos D y E.

Las pruebas para la interacción de plaqueta mediada por trombina o la liberación se han encontrado que no son específicos en naturaleza. Estos incluyen conteo de plaquetas, supervivencia de las plaquetas y pruebas para la liberación de plaquetas.
35

También se ha intentado el uso de fibrinógeno radiomarcado en relación con la identificación de los factores de coagulación pero se encuentra que consume tiempo y es difícil de realizar.

Así, la eficiencia de una prueba diagnóstica se basa en su capacidad de indicar la presencia o ausencia de la enfermedad. Existen principios esenciales bien reconocidos para estudios que determinan la eficacia de una prueba diagnóstica que permite los cuatro índices de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo a ser determinado. El primer requerimiento es la adopción de un estándar adecuado para el diagnóstico. De forma ideal, este estándar debe ser ligeramente mayor que una definición clínica y debe ser tan específico como sea posible para la entidad de la enfermedad. Una dificultad inherente en relación a DVT y PE en particular es que muchas de las pruebas de laboratorio rutinariamente disponibles también carecen de especificidad diagnóstica. Un conteo de plaquetas bajo soporta la probabilidad de estas condiciones pero puede ocurrir como un hallazgo aislado secundario a la infección. Las limitaciones similares aplican a muchos de los ensayos de coagulación. La hipofibrinogenemia no distingue entre fibrinólisis primaria, debido a la acción de plasmina o elastasas y la fibrinólisis secundaria sigue la conversión mediada por trombina de fibrinógeno a fibrina. Alternativamente, están disponibles las pruebas de sensibilidad de las pruebas de trombina pero son antecedentes obvios de su uso clínico. Un ejemplo es el ensayo FPA que, aunque específico para la acción de trombinas, es exquisitamente sensible y puede detectar la coagulación intravascular localizada que produce un resultado positivo en la trombosis venosa no complicada. Esta significancia clínica de un nivel FPA elevado, aún con una prueba de paracoagulación positiva, es entonces el hecho, particularmente si son normales el conteo de plaquetas, las pruebas de coagulación global y el nivel de fibrinógeno.
40
45
50

Por estas razones, los valores de sensibilidad, especificidad y los valores predictivos no se pueden determinar en forma estándar. La presentación clínica de estos trastornos es compleja e impredecible. La aplicación de las pruebas disponibles para el diagnóstico son, por lo tanto, mejor consideradas en relación con los diferentes síndromes clínicos de coagulación intravascular.

- 5 Se describe el anticuerpo monoclonal de murino 3B6 (Patente Estadounidense No. 4,758,524). Este anticuerpo es específico para el dímero D y representa el primer anticuerpo específico a la coagulación. La capacidad de utilizar este anticuerpo, sin embargo, en humanos como un agente diagnóstico sistémico se limita debido a la inmunogenicidad de la molécula. Permanece una necesidad, por lo tanto, de modificar el anticuerpo 3B6 para reducir su inmunogenicidad en animales no murinos y humanos.

10 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende", o variaciones tal como "que comprenden" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado o entero o grupo de elementos o enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

- 15 Los artículos "un" y "una" se utilizan aquí para referirse a uno o más de un (es decir a por lo menos un) objeto gramático del artículo. Por vía de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

En el trabajo conducido en la presente invención, se utiliza tecnología de desinmunización para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo 3B6. Esto ha permitido el desarrollo de un procedimiento diagnóstico para la formación de imágenes de trombosis para uso en humanos. Adicionalmente, la forma desinmunizada del anticuerpo 20 3B6 permite su uso como un agente objetivo de coágulo para suministrar disolución de coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos tal como anti-coagulantes en el sitio de un coágulo. Las moléculas desinmunizadas de la presente invención actúan, por lo tanto, como portadores de agentes terapéuticos y diagnósticos en un sitio objetivo tal como un coágulo. Las moléculas también tienen sus propias propiedades diagnósticas o terapéuticas. El desarrollo de una forma desinmunizada del anticuerpo 3B6 tiene aplicación para un rango de condiciones tal como 25 DVT y PE. Adicionalmente, los anticuerpos desinmunizados 3B6 se pueden utilizar en combinación con técnicas de formación de imagen plana o de medicina nuclear topográfica asistida por computador tal como CT, MRI o ultrasonido.

La presente invención proporciona, por lo tanto, una molécula portadora de manera general en la forma de una molécula inmunoreactiva y en particular un anticuerpo monoclonal presentado quimérico y/o mutado relativo a una 30 molécula progenitora de tal manera que exhibe capacidad reducida para inmunogenicidad en un anfitrión objetivo, tal como un humano. El proceso de quimerismo o mutación se denomina aquí como desinmunización. En una realización particularmente preferida, la molécula inmunoreactiva tal como el anticuerpo monoclonal es humanizado para reducir su inmunogenicidad en humanos. La desinmunización se puede conducir en diferentes formas pero en una realización preferida, uno o más aminoácidos en la región variable (v) de un anticuerpo monoclonal mutante (por 35 ejemplo sustituido) para reducir el reconocimiento de MHC II de péptidos derivados de esta región. En otras palabras, el proceso de desinmunización está dirigido a reducir una respuesta inmune mediada por el epítipo de célula T para el anticuerpo. El anticuerpo más preferido de la presente invención es una forma desinmunizada de anticuerpo monoclonal 3B6 de murino que exhibe especificidad para el dímero D. La generación de una forma desinmunizada de 3B6 permite el desarrollo inter alia de un agente objetivo de coágulo sistémico para coágulo 40 sanguíneos en humanos. Esto permite su uso como un agente formador de imágenes y como un vehículo para suministrar la disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos tal como en el sitio de un coágulo.

El anticuerpo desinmunizado actúa, por lo tanto, solo o como un portador para un rango de agentes terapéuticos y/o diagnósticos.

- 45 De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la presente invención proporciona una variante de una molécula inmunoreactiva que comprende una porción que tiene especificidad para los derivados de fibrina reticulada y cuya porción se deriva de una molécula inmunoreactiva que se puede obtener de una criatura animal o ave en donde la variante exhibe inmunogenicidad reducida en otra criatura animal o ave de la misma o de diferentes especies.

Preferiblemente, la molécula inmunoreactiva es un anticuerpo monoclonal variante que comprende una porción que 50 tiene especificidad para los derivados de fibrina reticulada.

Más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal es una variante de un anticuerpo monoclonal derivado de murino que tiene especificidad para el dímero D derivado de humano y otros derivados de fibrina reticulada y sin reactividad con fibrinógeno o productos de degradación de fibrinógeno inclusive de fragmentos D y E en donde el anticuerpo monoclonal derivado de murino variante es sustancialmente no inmunogénico en un humano.

Preferiblemente, el anticuerpo es una molécula de anticuerpo desinmunizada que tiene especificidad para un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 3B6 y que comprende por lo menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los derivados de dominio variable del anticuerpo monoclonal 3B6 y las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula desinmunizada de anticuerpo se derivan de una inmunoglobulina o un análogo de la misma del anfitrión para el cual el anticuerpo se desinmuniza.

La presente invención proporciona, por lo tanto, una molécula de anticuerpo desinmunizada que tiene especificidad para un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 3B6 en donde por lo menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio variable de dicho anticuerpo desinmunizado se deriva del anticuerpo monoclonal 3B6 en donde uno o más aminoácidos en una región variable de dicho anticuerpo 3B6 muta para reducir el reconocimiento MHC clase II de los péptidos derivados de esta región.

La presente invención proporciona adicionalmente una variante de anticuerpo monoclonal 3B6 de murino desinmunizado para uso en humanos que comprende una o más mutaciones de aminoácido en la región v del anticuerpo 3B6 designado para eliminar o reducir los fragmentos de péptido de la región v asociada con la molécula MHC clase II.

Las moléculas inmunoreactivas desinmunizadas son útiles solas o como portadores de agentes diagnósticos y/o terapéuticos en un sitio objetivo tal como un coágulo de sangre.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención contempla un método para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano al introducir en el paciente una forma desinmunizada de anticuerpo monoclonal 3B6 de murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo marcado con una molécula reportera que permite la diseminación del anticuerpo marcado a través del sistema circulatorio y luego someter el paciente para reportar el medio de detección de molécula para identificar la localización del anticuerpo en un coágulo.

En una realización alternativa, la forma desinmunizada de 3B6 no se marca pero se marca un segundo anticuerpo tiene especificidad anti-inmunoglobulina. Este anticuerpo forma un complejo marcado con el primer anticuerpo mencionado.

Como un portador, el portados desinmunizado puede suministrar cualquier molécula de unión de coágulo en el sitio de un coágulo así como también otros agentes diagnósticos o terapéuticos.

La presente invención contempla, por lo tanto, el uso de un anticuerpo monoclonal de murino desinmunizado específico para el dímero D u otros derivados de fibrina reticulada en la fabricación del agente de formación de imágenes de coágulo.

Todavía otro aspecto de la presente invención contempla un método para facilitar la disolución o remoción de un coágulo de sangre en un humano, dicho método comprende administrar a dicho humano una disolución del coágulo o cantidad efectiva de prevención de crecimiento de coágulos de un anticuerpo monoclonal derivado de murino variante que tiene especificidad para el dímero D derivado de humano y otros derivados de fibrina reticulada y sin reactividad con fibrinógeno o productos de degradación de fibrinógeno inclusive de fragmentos D y E en donde dicho anticuerpo monoclonal derivado de murino variante es sustancialmente no inmunogénico en un humano en donde dicho anticuerpo monoclonal comprende adicionalmente una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos fusionados, unidos o de otra forma asociados a esto.

Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige al uso de un anticuerpo monoclonal derivado de murino variante que tiene especificidad para el dímero D derivado de humano y otros derivados de fibrina reticulada y sin reactividad con fibrinógeno o productos de degradación de fibrinógeno inclusive de los fragmentos D y E en donde dicho anticuerpo monoclonal derivado de murino variante es sustancialmente no inmunogénico en un humano y dicho anticuerpo comprende adicionalmente una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos fusionado, unido o de otra forma adherido a este en la fabricación de un medicamento para la disolución un coágulo de sangre en un humano.

Una molécula preferida es un anticuerpo monoclonal 3B6 de murino desinmunizado variante para uso en humanos y que comprende una combinación de regiones v de cadena liviana y pesada que comprende las secuencias de aminoácido codificadas por las secuencias de nucleótido seleccionadas de la SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:11 o combinaciones de las secuencias de aminoácido codificadas por las secuencias de nucleótido que tienen por lo menos 70% de similitud en una o ambas secuencias de aminoácido en cada uno de los pares listados anteriormente o las secuencias de nucleótido capaces de hibridar en condiciones de baja exigencia en una o ambas secuencias de nucleótido o sus formas de complementariedad en cada uno de los pares listados anteriormente.

5 El anticuerpo desinmunizado 3B6 variante para uso comprende preferiblemente una combinación de regiones v de cadena liviana y pesada que comprenden las secuencias de aminoácido seleccionadas de SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2/SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5,

Otra variante preferida de 3B6 comprende una combinación de regiones v de cadena liviana y pesada seleccionadas de VHv5/VKv1, VHv6/VKv1, VHv7/VKv1, VHv5/VKv7, VHv6/VKv7, VHv6/VKv4, VHv7/VKv4, VHv7/VKv7 y VHv5/VKv4.

10 Otro aspecto de la presente invención contempla un método para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano al introducir en el paciente una forma desinmunizada de anticuerpo monoclonal 3B6 de murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo marcado con una molécula reportera que permite la diseminación del anticuerpo marcado a través del sistema circulatorio y luego someter el paciente a una exploración de medicina nuclear tomográfica asistida por computador para visualizar el coágulo.

15 Todavía otro aspecto de la presente invención contempla un método para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano al introducir en el paciente una forma desinmunizada del anticuerpo monoclonal 3B6 de murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo marcado con una molécula reportera que permite la diseminación del anticuerpo marcado a través del sistema circulatorio y luego someter dicho paciente a formación de imágenes de coágulo planas para visualizar el coágulo.

20 La molécula inmunoreactiva desinmunizada de la presente invención también es útil para anclar un anti-coagulante en un sitio particular. Este aspecto proporciona, por lo tanto, anclaje específico de tejido de un agente terapéutico o diagnóstico a, por ejemplo, un coágulo. Adicionalmente, la molécula inmunoreactiva se puede construir por ingeniería por tener múltiples especificidades. Por ejemplo, se contempla un anticuerpo desinmunizado biespecífico que comprende una especificidad para un coágulo y otra especificidad en un sitio de un coágulo (por ejemplo en un receptor celular). Esto permite al anticuerpo permanecer en el sitio del coágulo.

25 En una alternativa, se contempla un tratamiento de múltiples etapas en donde, por ejemplo, el 3B6 desinmunizado u otra molécula interactiva conjugada con un anti-coagulante se administra al coágulo objetivo y forma un complejo y luego un segundo anticuerpo dirigido al primer anticuerpo y/o el anti-coagulante se administra para mejorar o monitorear el primer complejo.

30 La molécula inmunointeractiva desinmunizada también se puede utilizar para determinar las cinéticas de la disipación del coágulo o la desaparición del coágulo. Esto es útil para predecir aún la aparición o desaparición temprana de los coágulos y, por lo tanto, ayuda a determinar las cinéticas cuando se inician los segundos tratamientos tal como tratamientos anti-coagulantes.

35 La presente invención proporciona adicionalmente conjugados que comprenden las moléculas inmunoreactivas desinmunizadas y las etiquetas terapéuticos y/o de formación de imágenes. Ejemplos de etiquetas de formación de imágenes incluyen MRI, ultrasonido y etiquetas CT. Ejemplos de etiquetas terapéuticas incluyen isótopos radioactivos, agentes anti-coagulación y citoquinas.

Un resumen de identificadores de secuencia utilizados a través de la especificación objeto se proporciona en la Tabla 1.

TABLA 1 Resumen de los Identificadores de Secuencia

ID DE SECUENCIA NO:	DESCRIPCIÓN
1	Aminoácido de 3B6DIVHv5
2	Aminoácido de 3B6DIVHv6
3	Aminoácido de 3B6DIVHv7
4	Aminoácido de 3B6DIVKv1

(continuación)

ID DE SECUENCIA NO:	DESCRIPCIÓN
5	Aminoácido de 3B6DNKv4
6	Aminoácido 3B6DIVKv7
7	Secuencia de nucleótido que codifica 3B6DIVHv5
8	Secuencia de nucleótido que codifica 3B6DIVHv6
9	Secuencia de nucleótido que codifica 3B6DIVHv7
10	Secuencia de nucleótido que codifica 3B6DNKv1
11	Secuencia de nucleótido que codifica 3B6DNKv4
12	Secuencia de nucleótido que codifica 3B6DNKv7

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 La figura 1 es una representación que muestra (A) un esquema del anticuerpo monoclonal 3B6; (B) una fotografía de unión 3B6 a coágulos de sangre (x4,2000 de magnificación).

La figura 2 es una representación esquemática de un anticuerpo 3B6 marcado con una etiqueta nuclear (^{99m}Tc).

La figura 3A es una representación diagramática que muestra la administración de 3B6 ^{99m}Tc al sistema circulatorio de un humano.

- 10 La figura 3B es una representación fotográfica que muestra la visualización de coágulos sanguíneos en la parte anterior de los muslos como radiación de concentrados ^{99m}Tc en el sitio del coágulo.

Las Figuras 4A, 4B y 4C son representaciones gráficas que muestran el ensayo de captura del dímero D utilizando los anticuerpos monoclonales desinmunizados 3B6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

- 15 La presente invención se predice en parte en la aplicación de técnicas bioquímicas para presentar una molécula inmunoreactiva derivada de una criatura animal o ave sustancialmente no inmunogénica en otra criatura animal o ave de la misma especie o de especies diferentes. El proceso bioquímico se denomina aquí como "desinmunización". La referencia aquí a "desinmunización" incluye procesos tal como injerto de región determinante de complementariedad (CDR), "reconformación" con respecto a una región de estructura de una molécula inmunoreactiva y mutación de región variable (v), todos dirigidos a reducir la inmunogenicidad de una molécula inmunoreactiva en un anfitrión particular. En el presente caso, la molécula inmunoreactiva preferida es un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal. En una realización más preferida, la molécula inmunoreactiva es un anticuerpo monoclonal, derivado de una criatura animal o ave y que exhibe inmunogenicidad reducida en otra criatura animal o ave de la misma especie o de especies diferentes.
- 20
- 25 La presente invención se relaciona de manera general con moléculas portadoras derivados de una especie o cepa de animal o ave y que son sustancialmente no inmunogénicas cuando se exponen a un sistema inmune de una especie o cepa de otra criatura animal o ave. Las moléculas portadoras pueden exhibir propiedades diagnósticas o terapéuticas útiles per se o se pueden utilizar para suministrar compuestos activos (por ejemplo agentes anticoagulantes, isótopos radioactivos) en un sitio objetivo. De manera general, las moléculas portadoras son

moléculas inmunoreactivas. Más particularmente, la presente invención se dirige a una forma desinmunizada que incluye una forma de mamífero no murino de un anticuerpo monoclonal derivado de murino sustancialmente incapaz de inducir una respuesta inmune contra sí mismo en un animal no murino y en particular un humano. Aún más particularmente, la presente invención proporciona una forma desinmunizada del anticuerpo monoclonal 3B6 de murino de tal manera que es incapaz de, o exhibe capacidad reducida para, inducir una respuesta inmune sustancial contra sí mismo o sus derivados cuando se administra a un humano. Las moléculas inmunoreactivas desinmunizadas y en particular los anticuerpos de la presente invención tienen un rango de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas útiles tal como en la detección de coágulos de sangre en el sistema circulatorio de un humano y como el agente objetivo de un coágulo para suministrar una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos tal como un anticoagulante. La forma desinmunizada que incluye formas humanizadas del anticuerpo monoclonal objeto son particularmente útiles en el diagnóstico y tratamiento de condiciones tal como trombosis de vena profunda y embolismo pulmonar. Las moléculas de la presente invención son particularmente útiles como agentes para suministrar los compuestos activos en un sitio objetivo. Tales compuestos activos incluyen molécula de unión de coágulos.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la presente invención proporciona un variante de una molécula inmunoreactiva, dicha variante comprende una porción que tiene especificidad para derivados de fibrina reticulada y cuya porción se deriva de una molécula inmunoreactiva que se puede obtener de una criatura animal o ave en donde dicha variante exhibe inmunogenicidad reducida en otra criatura animal o ave de la misma especie o de especies diferentes.

Como se indicó anteriormente, la forma preferida de la molécula inmunoreactiva es un anticuerpo y en particular un anticuerpo monoclonal.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal variante que comprende una porción que tiene especificidad para derivados de fibrina reticulada y cuya porción se deriva de un anticuerpo monoclonal que se puede obtener de una primera criatura animal o ave en donde dicha variante exhibe inmunogenicidad reducida en una segunda criatura animal o ave de la misma especie o de especies diferentes.

En una realización particularmente preferida, se obtiene un anticuerpo monoclonal de un animal murino y se desinmuniza con respecto a otro animal murino o una especie diferente de animal tal como un humano. El anticuerpo monoclonal de murino surge en el animal de murino en el dímero D no desnaturalizado que se deriva de fibrinógeno. La última molécula se digiere mediante plasmina y genera un rango de los fragmentos designados fragmentos A a E. La reticulación de fibrina con el Factor XIIIa forma dímeros del fragmento D denominados como "dímero D". El dímero D es una molécula de aproximadamente 189,000 daltons y comprende dos grupos funcionales del fragmento D unidos mediante enlaces reticulados entre los remanente de la cadena y de fibrinógeno.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la presente invención se dirige a un anticuerpo monoclonal derivado de murino variante que tiene especificidad para el dímero D derivado de humano y otros derivados de fibrina reticulada y sin reactividad con fibrinógeno o productos de degradación de fibrinógeno inclusive de los fragmentos D y E en donde dicho anticuerpo monoclonal derivado de murino variante es sustancialmente no inmunogénico en un humano.

la referencia a "sustancialmente no inmunogénico" incluye inmunogenicidad reducida comparado con el anticuerpo progenitor, es decir un anticuerpo antes de la exposición a los procesos de desinmunización. El término "inmunogenicidad" incluye una capacidad de provocar, inducir o de otra forma facilitar la respuesta mediada por célula T y/o humoral en un animal anfitrión. Particularmente los criterios inmunogénicos convenientes incluyen la capacidad para secuencias de aminoácido derivadas de una región variable (v) de un anticuerpo que interactúa con la molécula MHC clase II estimulando y facilitando por lo tanto una respuesta mediada por célula T que incluye una respuesta humoral asistida por célula T. La molécula inmunoreactiva y en particular un anticuerpo monoclonal contemplado por la presente invención incluye referencia a un agente objetivo de coágulo.

El anticuerpo monoclonal derivado de murino preferido se denomina aquí como anticuerpo monoclonal 3B6 que se describe en la Patente Estadounidense No. 4,758,524.

De acuerdo con lo anterior, en una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona una forma desinmunizada del anticuerpo monoclonal 3B6 en donde dicho 3B6 desinmunizado es sustancialmente no inmunogénico en humanos.

De nuevo, "sustancialmente no inmunogénico" en este contexto significa una capacidad reducida del anticuerpo monoclonal desinmunizado 3B6 para inducir o facilitar una respuesta inmune contra sí mismo (luego de la administración inicial o posterior) en un humano comparado con el anticuerpo monoclonal 3B6 de murino, antes de la desinmunización.

Aunque la invención preferida se dirige particularmente a una forma desinmunizada del 3B6 con respecto a los humanos, la presente invención se extiende a este anticuerpo u otro anticuerpo con una especificidad similar para el dímero D y/o otros derivados de fibrina reticulada desinmunizada para cualquier otra especie de animal o ave.

5 La referencia aquí a otros derivados de fibrina reticulada incluyen, por ejemplo, en adición al dímero D, derivados del dímero D y un complejo que comprende los fragmentos D y E. El último incluye (DD)E y se forma mediante la degradación de plasmina de la fibrina humana reticulada y comprende una combinación de dos fragmentos D y el fragmento E. Otros derivados reticulados incluyen DY, YY, XD, XY, DXD y YXD en donde las letras representan fragmentos de fibrinógeno formados luego de la degradación mediante plasmina en donde X y Y son diferentes y se seleccionan de los fragmentos A a C y E. Preferiblemente, el anticuerpo desinmunizado de la invención objeto se deriva de un anticuerpo específico para el dímero D y otros derivados de fibrina reticulada que no reaccionan en forma cruzada con fibrinógeno, productos de degradación de fibrinógeno inclusive del fragmento D y fragmento E. Preferiblemente, los clones que producen el anticuerpo se seleccionan utilizando fase de solución de las moléculas de dímero D a diferencia del dímero D inmovilizado.

15 Preferiblemente, el anticuerpo desinmunizado exhibe una afinidad para su antígeno objetivo que es similar a la afinidad exhibida por el anticuerpo monoclonal 3B6 de murino.

"Afinidad" en relación a la interacción entre un sitio de unión a antígeno individual en una molécula de unión a antígeno y su sitio correspondiente en el antígeno incluye la resistencia de esta interacción.

20 "Anticuerpo" significa una proteína de la familia de inmunoglobulina que es capaz de combinar, interactuar o de otra forma se asociada con una antígeno. Un anticuerpo es, por lo tanto, una molécula de unión a antígeno. Un "anticuerpo" es un ejemplo de una molécula inmunoreactiva e incluye un anticuerpo monoclonal o policlonal. Las moléculas inmunoreactivas preferidas de la presente invención son anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo incluye partes del mismo que incluyen porciones Fab y los determinantes de unión a antígeno.

25 El término "antígeno" se utiliza aquí en su sentido más amplio se refiere a una sustancia que es capaz de reaccionar en y/o inducir una respuesta inmune. La referencia a un "antígeno" incluye un determinante antigénico o epítipo. El antígeno en el contexto actual se presenta como la molécula inmunoreactiva y, más particularmente, un anticuerpo monoclonal.

30 Cualquier molécula que tiene afinidad de unión para un antígeno objetivo se denomina como "molécula de unión a antígeno". Se entenderá que este término se extiende a inmunoglobulinas (por ejemplo anticuerpos policlonales o monoclonales), fragmentos de inmunoglobulina y estructuras de proteína derivadas de no inmunoglobulina que exhiben actividad de unión a antígeno. Los términos "anticuerpo" y "moléculas de unión a antígeno" incluyen formas desinmunizadas de estas moléculas.

35 Aquella parte de una molécula antigénica contra la cual se dirige una respuesta inmune particular se denomina como "determinante antigénico" o "epítipo" e incluye un hapteno. Típicamente, en un animal, antígenos presentes en varios o aún muchos determinantes antigénicos simultáneamente. Un "hapteno" es una sustancia que puede combinar la especificidad con un anticuerpo pero no puede o solo induce pobremente una respuesta inmune a menos que esté vinculado a un portador. Un hapteno típicamente comprende un determinan antigénico único o epítipo.

40 Como se indicó anteriormente, aunque los anticuerpos preferidos de la presente invención son formas desinmunizadas de anticuerpos monoclonales de murino para uso en humanos, la invención objeto se extiende a anticuerpos de cualquier fuente y se desinmunizado para uso en cualquier anfitrión. Ejemplos de fuentes animales y aves y anfitriones incluyen humanos, primates, animales de granja (por ejemplo ovejas, vacas, caballos, cerdos, burros), animales para pruebas de laboratorio (por ejemplo ratones, conejos, conejillos de indias, hámster), animales de compañía (por ejemplo perros, gatos), aves de corral (por ejemplo pollos, patos, gansos, pavos) y aves de juego (por ejemplo faisanes). Los anticuerpos desinmunizados o parte de los mismos también se pueden generar en tejidos de no animal tal como plantas. Las plantas son particularmente útiles como una fuente de anticuerpos monocatenarios.

Otro aspecto de la presente invención contempla un método para generar un anticuerpo monoclonal desinmunizado que tiene especificidad para determinantes antigénicos en el dímero D humano u otros derivados de fibrina reticulada, dicho método comprende:

50 (i) obtener un derivado de fibrina reticulada o extracto que contiene lo mismo de un humano;

(ii) generar un anticuerpo en un animal no humano específico para dicho derivado de fibrina reticulada pero que no reacciona en forma cruzada con el fragmento D; y

(iii) someter dicho anticuerpo derivado no humano a medios de desinmunización.

5 El derivado de fibrina reticulada se puede derivar de cualquier extracto antigénico que incluye degradación mediada por plasmina de coágulos de fibrina o mediante la acción simultánea de trombina, Factor XIIIa y plasmina en el fibrinógeno con formación de coágulo transitoria y lisis de coágulo posterior. En el último método, el fibrinógeno se convierte a fibrina mediante la acción de trombina y Factor XIIIa y posteriormente se digiere con plasmina. Por supuesto, se apreciará que el derivado de fibrina o extracto que contiene el mismo se puede obtener de una fuente animal diferente a humano. La fuente antigénica es convenientemente de una muestra biológica.

Una muestra que se puede extraer, no tratar, tratar, diluir o concentrar de un animal se incluye en el término "muestra biológica".

10 El método anterior para obtener la fracción antigénica cruda se representa en un método in vitro. Un método in vivo adecuado incluye obtener suero u otro fluido corporal que contiene el derivado de fibrina reticulada de un animal que incluye humano y someter el fluido corporal a un proceso PAGE en donde se aísla el derivado de fibrina reticulada sustancialmente puro.

15 Alternativamente, se pueden purificar derivados de fibrina reticulada del suero obtenido de pacientes que sufren de severos trastornos tromboticos con base en una técnica utilizando filtración de gel en combinación con cromatografía de intercambio de ión como se describe por Willner et al., *Biochemistry* 21: 2687-2692, 1982.

20 El antígeno (es decir el dímero D u otro derivado de fibrina reticulada) se puede separar de la muestra biológica mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la separación puede tomar ventaja de una cualquiera o más de las propiedades de carga de superficie de antígeno, tamaño, densidad, actividad biológica y su afinidad durante otra entidad (por ejemplo otra proteína o compuesto químico al cual se une o de otra forma se asocia). Así, por ejemplo, la separación del antígeno del fluido biológico se puede lograr por uno o más de ultra-centrifugación, cromatografía de intercambio de ión (por ejemplo cromatografía de intercambio de anión, cromatografía de intercambio de catión), electroforesis (por ejemplo electroforesis de gel poliacrilamida, enfoque isoeléctrico), separación de tamaño (por ejemplo, filtración de gel, ultra-filtración) y separación mediada por afinidad (por ejemplo separación de inmutafinidad que incluye, pero no se limita a, separación de glóbulos magnéticos tal como separación Dynabead™, inmunocromatografía, inmuno-precipitación). La selección de las técnicas de separación empleadas puede depender de la actividad biológica o las propiedades físicas del antígeno particular.

30 Preferiblemente, la separación del antígeno del fluido biológico preserva los epítomos conformacionales presentes en la superficie del antígeno y, así, evita adecuadamente técnicas que originan la desnaturalización del antígeno. Las personas expertas en la técnica reconocerán la importancia de mantenimiento o imitación tanto como sea posible de las condiciones fisiológicas peculiares en el antígeno (por ejemplo el fluido biológico del que ellos se obtienen) para asegurar que los determinantes antigénicos o los sitios activos en el antígeno, que se exponen al animal, son estructuralmente idénticos que del antígeno nativo. Esto asegura el surgimiento de anticuerpos apropiados en el animal inmunizado que reconocería el antígeno nativo. En una realización preferida de este tipo, el antígeno se separa del fluido biológico utilizando uno cualquiera o más de separación de afinidad, filtración de gel y ultra-filtración.

40 La inmunización y producción posterior de los anticuerpos monoclonales se puede llevar a cabo utilizando protocolos estándar como se describe por ejemplo por Köhler and Milstein (*Nature* 256: 495-499, 1975; Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6 (7): 511-519, 1976), Coligan et al. (*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 1991-1997) o Toyama et al. (*"Monoclonal Antibody, Experiment Manual"*, publicado por Kodansha Scientific, 1987). Esencialmente, se inmuniza un animal con un fluido biológico que contiene antígeno o fracción del mismo mediante métodos estándar para producir células que producen anticuerpos, particularmente células somáticas que producen anticuerpos (por ejemplo linfocitos B). Estas células luego se pueden remover del animal inmunizado para inmortalización. El antígeno puede necesitar estar primero asociado con una molécula más grande. La última es cualquier sustancia típicamente de alto peso molecular en la cual una sustancia pobremente inmunogénica o no inmunogénica (por ejemplo un hapteno) se liga naturalmente o artificialmente para mejorar su inmunogenicidad.

50 La inmortalización de las células que producen anticuerpo se puede llevar a cabo utilizando métodos, que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inmortalización se puede lograr mediante el método de transformación utilizando el virus Epstein-Barr (EBV) (Kozbor et al., *Methods in Enzymology* 121: 140, 1986). En una realización preferida, las células que producen anticuerpo utilizando el método de fusión celular (descrito en Coligan et al., 1991-1997, supra), se emplean ampliamente para la producción de anticuerpos monoclonales. En este método, las células que producen el anticuerpo somático con el potencial para producir anticuerpos, particularmente células B, se fusionan con una estirpe celular de mieloma. Estas células somáticas se pueden derivar de los ganglios linfáticos, el bazo y la sangre periférica de animales cebados, preferiblemente animales roedores tal como ratones y ratas. En la realización de ejemplo de esta invención se utilizan células de bazo de ratón. Sería posible, sin embargo, utilizar células de ratas, conejos, ovejas o cabras, o células de otras especies animales en su lugar.

Las estirpes celulares especializadas de mieloma se han desarrollado de tumores linfocíticos para uso en procedimientos de fusión que producen hibridoma (Köhler and Milstein, 1976, supra; Shulman et al., Nature 276: 269-270, 1978; Volk et al., J. Virol. 42 (1): 220-227, 1982). Estas estirpes celulares se han desarrollado para por lo menos tres razones. La primera es para facilitar la selección de hibridomas fusionados de células de mieloma que se autopropan indefinidamente de forma similar o no se fusionan. Usualmente, esto se lleva a cabo al utilizar mielomas con deficiencias de enzima que se presentan incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de hibridomas. La segunda razón surge de la capacidad inherente de células de tumor linfocíticas para producir sus propios anticuerpos. Para eliminar la producción de los anticuerpos de células de tumor mediante los hibridomas, se utilizan estirpes celulares de mieloma incapaces de producir cadenas de inmunoglobulina pesadas o livianas endógenas. Una tercera razón para la selección de estas estirpes celulares es por su adecuabilidad y eficiencia para fusión.

Se pueden utilizar muchas estirpes celulares de mieloma para la producción de híbridos celulares fusionados, que incluyen, por ejemplo P3X63-Ag8, P3X63-AG8.653, P3/NS1-Ag4-1 (NS-1), Sp2/0-Ag14 y S194/5.XXO.Bu.1. Las estirpes celulares P3X63-Ag8 y NS-1 se han descrito Köhler and Milstein (1976, supra). Shulman et al. (1978, supra) desarrolla la estirpe celular Sp2/0-Ag14. La estirpe S194/5.XXO.Bu.1 se reporta por Trowbridge (J. Exp. Med. 148(1): 313-323, 1978).

Los métodos para generar híbridos de células de ganglio linfático o de bazo que produce anticuerpo involucran usualmente mezclar células somáticas con células de melanoma en una relación 10:1 (aunque la relación puede variar de aproximadamente 20: 1 a aproximadamente 1:1), respectivamente, en la presencia de un agente o agentes (químico, vírico o eléctrico) que promueve la fusión de las membranas celulares. Los métodos de fusión se han descrito en (Köhler and Milstein, 1975, supra; Köhler and Milstein, 1976, supra; Geffer et al., Somatic Cell Genet. 3: 231-236, 1977; Volk et al., 1982, supra). Los agentes que promueven la fusión utilizados por aquellos investigadores son el virus Sendai y polietilenglicol (PEG).

Debido a que los procedimientos de fusión producen híbridos viables en muy baja frecuencia (por ejemplo cuando se utilizan bazos de una fuente de células somáticas, solo se obtiene un híbrido aproximadamente cada 1×10^5 células de bazo), es preferible tener un medio para seleccionar los híbridos de célula fusionados de las células no fusionadas restantes, particularmente las células de mieloma no fusionadas. También es necesario un medio para detectar los hibridomas que producen anticuerpos entre otros que resultan de híbridos de células fusionadas. De manera general, la selección de híbridos de célula fusionada se lleva a cabo al cultivar las células en medio que soporta el crecimiento de hibridomas pero que evitan el crecimiento de las células de mieloma no fusionadas, que normalmente estarán indefinidamente divididas. Las células somáticas utilizadas en la fusión no mantienen viabilidad a largo plazo en cultivo in vitro y por lo tanto no posee un problema. En el ejemplo de la presente invención, se utilizan las células de mieloma que carecen de hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT-negativo). La selección contra estas células se hace en medio de hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT), un medio en el que los híbridos celulares fusionados sobreviven debido al genotipo HPRT-positivo de las células de bazo. También es posible el uso de células de mieloma con diferentes deficiencias genéticas (sensibilidades al fármaco, etc.) que se puede seleccionar contra el medio soporta el crecimiento de híbridos genotípicamente competentes.

Se requieren varias semanas para cultivar selectivamente los híbridos celulares fusionados. Temprano en este periodo de tiempo, es necesario para identificar aquellos híbridos que producen el anticuerpo deseado, ya que ellos se pueden clonar posteriormente y propagar. De manera general, cerca de 10% de los híbridos obtenidos producen el anticuerpo deseado, aunque no es común un rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 30%. La detección de los híbridos que produce anticuerpo se puede lograr mediante uno cualquiera de los varios métodos de ensayo estándar, que incluye técnicas de radioinmunoensayo e inmunoensayo ligado a enzima, por ejemplo, como se describe en Kennet et al. ((eds) Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, pp. 376-384, Plenum Press, New York, 1980). En una realización particularmente preferida, se desarrolla un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para seleccionar clones que producen anticuerpo utilizando el dímero D de fase de solución.

Una vez se han seleccionado híbridos celulares fusionados deseados y se clona en estirpes celulares que producen anticuerpos individuales, cada estirpe celular se puede propagar en dos formas estándar. Una suspensión se las células de hibridoma se puede inyectar en un animal histocompatible. El animal inyectado luego desarrollará tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido celular fusionado. Los fluidos corporales del animal, tal como suero o fluido de ascitis, se puede aprovechar para proporcionar anticuerpos monoclonales en alta concentración. Alternativamente, se pueden propagar estirpes celulares individuales in vitro en recipientes de laboratorio para cultivo. El medio de cultivo que contiene altas concentraciones de un único anticuerpo monoclonal específico se puede cosechar mediante decantación, filtración o centrifugación, y posteriormente se purifica.

Las estirpes celulares se prueban por su especificidad para detectar el antígeno de interés mediante cualquier medio de inmunodetección adecuado. Por ejemplo, las estirpes celulares se pueden dividir en alícuotas en un número de

5 pozos y se incuban y el sobrenadante de cada pozo se analiza mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), técnica de anticuerpo de fluorescencia indirecta, o similares. Las estirpes celulares que producen un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer el antígeno objetivo pero que no reconoce los epítomos sin objetivo reconocidos se identifican y luego se cultivan directamente in vitro o se inyectan en un animal histocompatible para formar tumores y para producir, recolectar y purificar los anticuerpos requeridos.

Así, la presente invención proporciona en una primera etapa anticuerpos monoclonal que interactúan específicamente con el dímero D u otro derivado de fibrina reticulada.

10 Como se indicó anteriormente, las células de no animal tal como células de planta, levadura y/o microbianas se pueden utilizar para generar típicamente anticuerpos monocatenarios. En esta realización, tales células se construyen por ingeniería para expresar las moléculas de ácido nucleico que codifican una cadena de un anticuerpo.

15 El anticuerpo monoclonal luego se somete a medios de desinmunización. Tal un proceso puede tomar cualquiera de un número de formas que incluyen la preparación de anticuerpos quiméricos que tienen la misma o especificidad similar como los anticuerpos monoclonales preparados de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena liviana y pesada se han construido, típicamente mediante ingeniería genética, de los genes de región constante y variable de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Así, de acuerdo con la presente invención, una vez se obtiene un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal deseado, se utilizan técnicas para producir anticuerpos monoclonales interespecíficos en donde la región de unión de una especie se combina con una región sin unión en el anticuerpo de otra especie (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987). Por ejemplo, los CDR de anticuerpo monoclonal no humano (por ejemplo murino) se pueden injertar en un anticuerpo humano, como el anticuerpo de murino "humanizante" (Publicación de Patente Europea No. 0 239 400; Jones et al., Nature 321: 522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature 332: 323-327, 1988). En este caso, el proceso desinmunizante es específico para los humanos. Más particularmente, los CDR se pueden injertar en una región variable de anticuerpo humano con o sin regiones constantes humanas. El anticuerpo no humano proporciona que los CDR se denominen típicamente como el "donante" y el anticuerpo humano proporciona la estructura que se denomina típicamente como "receptor". Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si ellas están, ellas pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir por lo menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente aproximadamente 95% o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente los CDR, son sustancialmente idénticos a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humanas naturales. Así, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada o de cadena liviana humanizada. Un anticuerpo donante es dicho que es "humanizado", mediante el proceso de "humanización", debido a que el anticuerpo humanizado resultante se espera que se una al mismo antígeno como el anticuerpo donante que proporciona los CDR. La referencia aquí a "humanizado" incluye referencia a un anticuerpo desinmunizado para un anfitrión particular, en este caso, un anfitrión humano.

Se entenderá que los anticuerpos desinmunizados pueden tener sustituciones de aminoácido conservadoras que sustancialmente no tienen efecto en la unión de antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Las sustituciones conservadoras de ejemplo se pueden hacer de acuerdo con la Tabla 2.

TABLA 2

RESIDUO ORIGINAL	SUSTITUCIONES DE EJEMPLO
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn

(continuación)

RESIDUO ORIGINAL	SUSTITUCIONES DE EJEMPLO
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

5 Se describen métodos de ejemplo que se pueden emplear para producir anticuerpos desinmunizados de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, en Richmann et al., 1988, supra; Patente Estadounidense Nos. 6,056,957, 6,180,370 y 6,180,377 y Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901, 1987.

10 Así, en una realización, la presente invención contempla una molécula de anticuerpo desinmunizada que tiene especificidad para un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 3B6 en donde por lo menos una o por lo menos dos o por lo menos tres o por lo menos cuatro o por lo menos cinco de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio variable de dicho anticuerpo desinmunizado se deriva de dicho anticuerpo monoclonal 3B6 y las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula desinmunizada de anticuerpo se derivan de una inmunoglobulina o un análogo de la misma del anfitrión para el cual se desinmuniza el anticuerpo.

Este aspecto de la presente invención involucra la manipulación de la región de estructura de un anticuerpo no humano.

15 Preferiblemente, el anticuerpo desinmunizado es una forma humanizada de murino 3B6.

20 Un proceso de desinmunización preferido se denomina aquí como injerto de región variable (v) y resulta en un anticuerpo quimérico. El anticuerpo resultante comprende una o más sustituciones de aminoácido dentro de la región v cuando se compara con el anticuerpo actual (por ejemplo murino). La razón para hacer cambios en la región v es mejorar el potencial para una respuesta inmune inducida en el anfitrión previsto (por ejemplo un humano). La base de la desinmunización se predice en parte en la presunción que una respuesta inmune sustantiva para un anticuerpo introducido requiere una respuesta mediada por célula T. La activación para la respuesta de célula T es la presentación de péptidos procesados que emanan del anticuerpo introducido en la superficie de las células que presentan antígeno (APC). Los APC presentan tales péptidos en asociación con la superficie de la molécula MHC clase II. El método de desinmunización, por lo tanto, se basa en:-

25 (i) predecir las secuencias de péptido capaces de asociarse con las moléculas MHC clase II; y

(ii) cambiar residuos estratégicos para eliminar la capacidad del péptido para asociarse con la molécula MHC clase II.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la presente invención proporciona una variante de anticuerpo monoclonal 3B6 de murino desinmunizado para uso en humanos, dicha variante comprende una o más mutaciones de aminoácido en la región v de dicho anticuerpo 3B6 para eliminar o reducir los fragmentos de péptido de dicha región v asociada con la molécula MHC clase II.

Una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácido o una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de nucleótido se abarcan dentro del término "mutación" o "mutaciones".

En una realización particularmente preferida, los anticuerpos desinmunizados se generan mediante cotransfección de diferentes combinaciones de tres genes de cadena H desinmunizada y tres genes de cadena L desinmunizada. Las variantes resultantes se derivan de diferentes combinaciones codificadas por los genes de cadena L y de cadena H. Las cadenas H preferidas son Hv5, Hv6 y Hv7. Estas se denomina aquí como 3B6DIVHv5 (SEQ ID NO:1), 3B6DIVHv6 (SEQ ID NO:2) y 3B6DIVHv7 (SEQ ID NO: 3). Las cadenas L preferidas Kv1, Kv4 y Kv7. Estas se denominan aquí como 3B6DIVKv1 (SEQ ID NO:4), 3B6DIVKv4 (SEQ ID NO:5) y 3B6DIVKv7 (SEQ ID NO:6). Particularmente las combinaciones útiles incluyen VHv5/VKv1, VHv6/VKv1, VHv7/VKv1, VHvS/VKv7, VHv6/VKv7, VHv6/VKv4, VHv7/VKv4, VHv7/VKv7 y VHv5/VKv4. Los números de identificador de secuencia (SEQ ID NOS:) en paréntesis representan las secuencias de Aminoácido de las cadenas particulares. Las secuencias de nucleótido correspondientes que codifican cada uno de la SEQ ID NOS: 1-6 se representan por la SEQ ID NOS:7-12.

Todas tales combinaciones de las cadenas H y L también se abarcan por la presente invención.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal variante 3B6 de murino desinmunizado para uso en humanos, dicha variante comprende una combinación de regiones v de cadena liviana y pesada que comprende las secuencias de aminoácido codificadas por las secuencias de nucleótido seleccionadas de la SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:7/SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:8/SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:9/SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:11.

Todas tales combinaciones de cadenas H y L también se abarcan por la presente invención.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal variante 3B6 de murino desinmunizado para uso en humanos, dicha variante comprende una combinación de regiones v de cadena liviana y pesada que comprende las secuencias de aminoácido seleccionadas de SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5

Más particularmente, la presente invención proporciona una variante de un anticuerpo monoclonal 3B6 de murino desinmunizado para uso en humanos, dicha variante comprende una combinación de regiones v de cadena liviana y pesada seleccionadas de VHv5WKv1, VHv6/VKv1, VHv7/VKv1, VHv5/VKv7, VHv6/VKv7, VHv6/VKv4, VHv7/VKv4, VHv7/VKv7 y VHv5/VKv4.

El término "similitud" como se utiliza aquí incluye identidad exacta entre las secuencias comparadas en el nivel de nucleótido o aminoácido. En donde no existe identidad en el nivel de nucleótido, "similitud" incluye diferencias entre las secuencias que resultan en diferentes aminoácidos que se relacionan no obstante una con la otra en los niveles estructurales, funcionales, bioquímicos y/o conformacionales. En donde no existe identidad en el nivel de aminoácido, "similitud" incluye aminoácidos que se relacionan no obstante uno con el otro en los niveles estructurales, funcionales, bioquímicos y/o conformacionales. En una realización particularmente preferida, las comparaciones de nucleótido y secuencia se hacen en el nivel de identidad a diferencia de la similitud.

Los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "similitud de secuencia", "identidad de secuencia", "porcentaje de similitud de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", "sustancialmente similar" y "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es por lo menos 12 pero frecuentemente 15 a 18 y frecuentemente por lo menos 25 o menos, tal como 30 unidades de monómero, inclusive de nucleótidos y residuos de aminoácido, en longitud. Debido a que dos polinucleótidos cada uno pueden comprender (1) una secuencia (es decir solo una porción de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se desarrollan típicamente al comparar las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de típicamente 12 residuos contiguos que se compara con una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir

espacios) de aproximadamente 20% o menos cuando se compara con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación se puede conducir mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o mediante inspección y la mejor alineación (es decir que resulta del porcentaje de homología mayor sobre la ventana de comparación) se genera por cualquiera de los varios métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia BLAST de programas como, por ejemplo, se describe por Altschul et al. (Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402. 1997). Una discusión detallada de análisis de secuencia se puede encontrar en Unit 19.3 of Ausubel et al. ("Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15).

Los términos "similitud de secuencia" y "identidad de secuencia" como se utiliza aquí se refiere al grado que las secuencias son idénticas o funcionalmente o estructuralmente similares en una base de nucleótido por nucleótido o una base de aminoácido por aminoácido sobre una ventana de comparación. Así, un "porcentaje de identidad de secuencia", por ejemplo, se calcula al comparar dos secuencia óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, que divide el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicar el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Para los propósitos de la presente invención, "identidad de secuencia" se entenderá que significa el "porcentaje de coincidencia" calculado por el programa de computador DNASIS (Versión 2.5 para windows; disponible de Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA) utilizando estándares predeterminados como se utiliza en el manual de referencia que acompaña el software. Los comentarios similares aplican en relación a la similitud de secuencia.

Las mutaciones y derivados contemplados por la presente invención incluyen mutaciones redundantes en las secuencias de nucleótido que no resultan en un cambio en la secuencia de aminoácido. La referencia aquí a una baja exigencia incluye y abarca de por lo menos aproximadamente 0 a por lo menos aproximadamente 15% v/v de formamida y de por lo menos aproximadamente 1 M a por lo menos aproximadamente 2 M de sal para la hibridación, y por lo menos aproximadamente 1 M a por lo menos aproximadamente 2 M de sal para condiciones de lavado. De manera general, la baja exigencia es de aproximadamente 25-30°C a aproximadamente 42°C. La temperatura se puede alterar y las temperaturas mayores utilizadas para reemplazar formamida y/o para dar condiciones de exigencia alternativa. Las condiciones de exigencia alternativa se pueden aplicar cuando sea necesario, tal como exigencia media, que incluye y abarca de por lo menos aproximadamente 16% v/v a por lo menos aproximadamente 30% v/v de formamida y de por lo menos aproximadamente 0.5 M a por lo menos aproximadamente 0.9 M de sal para hibridación, y por lo menos aproximadamente 0.5 M a por lo menos aproximadamente 0.9 M de sal para condiciones de lavado, o alta exigencia, que incluye y abarca de por lo menos aproximadamente 31% v/v a por lo menos aproximadamente 50% v/v de formamida y de por lo menos aproximadamente 0.01 M a por lo menos aproximadamente 0.15 M de sal para hibridación, y por lo menos aproximadamente 0.01 M a por lo menos aproximadamente 0.15 M de sal para condiciones de lavado. En general, el lavado se lleva a cabo $T_m = 69.3 + 0.41 (G+C)\%$ (Marmur and Doty, J. Mol. Biol. 5: 109, 1962). Sin embargo, el T_m de un ADN dúplex se reduce por 1 °C con cada incremento de 1% en el número de pares base de emparejamiento incorrecto (Bonner and Laskey, J. Mol. Biol. 5: 109, 1962). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. De acuerdo con lo anterior, particularmente se define los niveles preferidos de exigencia como sigue: la baja exigencia es amortiguador 6 x SSC, 0.1% p/v de SDS a 25-42°C; una exigencia moderada es amortiguador 2 x SSC, 0.1% p/v de SDS en una temperatura en el rango de 20°C a 65°C; la alta exigencia es amortiguador 0.1 x SSC, 0.1% p/v de SDS en una temperatura de por lo menos 65°C.

Como se utiliza aquí, el término "CDR" incluye bucles estructurales CDR que cubre a tres regiones de cadena liviana y tres regiones de cadena pesada en la porción variable de una región de estructura de anticuerpo que puentea las cepas β en la porción de unión de la molécula. Estos bucles tienen estructuras canónicas características (Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799, 1992; Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Department of Health and Human Services, 1983).

Una región variable de cadena pesada o liviana de inmunoglobulina, que se interrumpe mediante tres regiones hipervariables, también denominadas como CDR, se denomina aquí como una "región de estructura". El grado de la región de estructura y los CDR se han definido precisamente (ver, por ejemplo, Krebber et al., J. Immunol. Methods 201(1): 35-55, 19). Las secuencias de las regiones de estructura de diferentes cadenas pesada o liviana se conservan relativamente dentro de una especie. Como se utiliza aquí, una "región de estructura humana" es una región de estructura que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85% o más, usualmente 90-95% o más) a la región de estructura de una inmunoglobulina humana de ocurrencia natural. La región de estructura de un anticuerpo, que es las regiones de estructura combinadas de las cadenas liviana y pesada constituyente, sirve para posicionar y alinear los CDR. Los CDR son principalmente responsables para la unión de un epítipo de un antígeno.

Como se utiliza aquí, el término "región variable de cadena pesada" significa un polipéptido que es de aproximadamente 110 a 125 residuos de aminoácido en longitud, la secuencia de aminoácido de la cual corresponde a aquella de una cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de la invención, partiendo del residuo de aminoácido de Terminal amino (Terminal N) de la cadena pesada. De forma similar, el término "región variable de cadena liviana" significa un polipéptido que es de aproximadamente 95 a 130 residuos de aminoácido en longitud, la secuencia de aminoácido de la cual corresponde a aquella de una cadena liviana de un anticuerpo monoclonal de la invención, partiendo del residuo de aminoácido de Terminal N de la cadena liviana. La inmunoglobulina de longitud completa "cadenas livianas" (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) se codifican por un gen de región variable en el terminal NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante κ o λ en el terminal COOH. La inmunoglobulina de longitud completa "cadenas pesadas" (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos), se codifican de forma similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante mencionados anteriormente, por ejemplo γ (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos).

El término "inmunogenicidad" se utiliza aquí en su sentido más amplio para incluir la propiedad para evitar una respuesta inmune dentro de un organismo. La inmunogenicidad depende típicamente parcialmente del tamaño de la sustancia en cuestión, y parcialmente a diferencia de lo que son las moléculas anfitrionas. Se considera de manera general que las proteínas altamente conservadas tienden a tener baja inmunogenicidad.

El término "inmunoglobulina" se utiliza aquí para referirse a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen las regiones constantes κ , λ , α , γ (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), δ , ϵ y μ , así como una miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste de dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, cada par tiene una cadena pesada y una cadena liviana. En cada par, las regiones variables de cadena pesada y liviana son juntas responsables para la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables para las funciones efectoras de anticuerpo. En adición a los anticuerpos, las inmunoglobulinas puede existir en una variedad de otras formas que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab, Fab' y (Fab')₂.

La referencia aquí a "inmunointeractivo" incluye la referencia a cualquier interacción, reacción, u otra forma de asociación entre moléculas y en particular en donde una de las moléculas es, o imita, un componente del sistema inmune. Una "molécula inmunoreactiva" incluye un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo sintético o una molécula de unión asociada a célula T (TABM).

"Aislado" significa material que es sustancialmente o esencialmente libre de componentes que lo acompañan normalmente en su estado nativo.

Una muestra de fluido biológico que se aísla de, o derivados de, una fuente particular del anfitrión se describe como "obtenido de".

La invención también contempla el uso y generación de los fragmentos de anticuerpos monoclonales producidos por el método de la presente invención que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂. Tales fragmentos se pueden preparar mediante métodos estándar por ejemplo como se describe por Coligan et al. (1991-1997, supra).

La presente invención también contempla moléculas de unión a antígeno recombinantes o sintéticas con la misma o especificidad similar como los anticuerpos monoclonales de la invención. Las moléculas de unión a antígeno de este tipo pueden comprender un fragmento Fb estabilizado sintético. Fragmentos de ejemplo de este tipo incluyen fragmentos Fv monocatenarios (sFv, frecuentemente llamados scFv) en el que se utiliza un ligador de péptido para puentear el Terminal N o el Terminal C de un dominio VH con el terminal C o el terminal N, respectivamente, de un dominio VL. El ScFv carece de todas las partes constantes de anticuerpos completos y no son capaces de activar el complemento. Los ligadores de péptido adecuados para la unión a los dominios VH y VL son aquellos que permiten a los dominios VH y VL doblar en una única cadena de polipéptido que tiene un sitio de unión a antígeno con una estructura tridimensional similar a aquella del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo completo del cual se deriva el fragmento Fv. Los ligadores que tienen las propiedades deseadas se pueden obtener mediante el método descrito en la Patente Estadounidense No 4,946,778. Sin embargo, en algunos casos está ausente un ligador. Se pueden preparar ScFvs, por ejemplo, de acuerdo con los métodos destacados en Krebber et al. (1997, supra). Alternativamente, ellos se pueden preparar mediante los métodos descritos en la Patente Estadounidense No 5,091,513, Patente Europea No 239,400 o los artículos por Winter and Milstein (Nature 349: 293, 1991) y Plückthun et al. (In Antibody engineering: A practical approach 203-252, 1996).

Alternativamente, el fragmento Fv estabilizado sintético comprende un Fb estabilizado de disulfuro (dsFv) en el que se introducen los residuos cisteína en los dominios VH y VL de tal manera que en la molécula Fb completamente plegada los dos residuos formarán un enlace de disulfuro. Los métodos adecuados para producir dsFv se describen, por ejemplo, en (Glockshuber et al., Biochem. 29: 1363-1367, 1990; Reiter et al., J. Biol. Chem. 269: 18327-18331,

1994; Reiter et al., *Biochem.* 33: 5451-5459, 1994; Reiter et al., *Cancer Res.* 54: 2714-2718, 1994; Webber et al., *Mol. Immunol.* 32: 249-258, 1995).

5 También se contemplan como moléculas de unión a antígeno recombinantes o sintéticas dominios de región variable única (llamados dAbs), por ejemplo, como se describe en (Ward et al., *Nature* 341: 544-546, 1989; Hamers-Casterman et al., *Nature* 363: 446-448, 1993; Davies & Riechmann, *FEBS Lett.* 339: 285-290, 1994).

10 Alternativamente, la molécula de unión a antígeno recombinante o sintética puede comprender un "minicuerpo". A este respecto, los minicuerpos son versiones pequeñas de anticuerpos completos, que codifican en una única cadena los elementos esenciales de un anticuerpo completo. De forma adecuada, el minicuerpo se comprende de los dominios VH y VL de un anticuerpo nativo fusionado en la región pivote y el dominio CH₃ de la molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, se describe en la Patente Estadounidense No 5,837,821.

15 En una realización alterna, la molécula de unión a antígeno recombinante o sintético puede comprender estructuras de proteína, derivadas de inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede hacer referencia a Ku & Schutz (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6552-6556, 1995) que describe un citocromo de proteína de cuatro hélices b562 que tiene dos bucles aleatorios para crear las regiones determinantes de complementariedad (CDR), que se han seleccionado para la unión a antígeno.

20 La molécula de unión a antígeno recombinante o sintética puede ser multivalente (es decir que tiene más de un sitio de unión a antígeno). Tales moléculas multivalentes pueden ser específicas para uno o más antígenos. Las moléculas multivalentes de este tipo se pueden preparar mediante dimerización de dos fragmentos de anticuerpo a través de un péptido que contiene cisteinilo, por ejemplo como se describe por (Adams et al., *Cancer Res.* 53: 4026-4034, 1993; Cumber et al., *J Immunol.* 149: 120-126, 1992;). Alternativamente, la dimerización se puede facilitar mediante la fusión de los fragmentos de anticuerpo para hélices anfifílicas que dimerizan naturalmente (Plüncckthun, *Biochem.* 31: 1579-1584, 1992) o mediante el uso de dominios (tal como leucine zippers jun y fos) que heterodimerizan preferencialmente (Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553, 1992). En la realización adicional, se emplea un proceso de múltiples etapas tal como al administrar primero un anticuerpo desinmunizado y luego un anti-anticuerpo con, por ejemplo, una molécula reportera.

30 La presente invención abarca adicionalmente análogos químicos de los aminoácidos en los anticuerpos variantes. El uso de análogos químicos de aminoácidos es útil inter alia para estabilizar las moléculas cuando se administra a un sujeto. Los análogos de los aminoácidos contemplados aquí incluyen, pero no se limitan a, modificaciones de cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de péptido, polipéptido o proteína y el uso de reticuladores y otros métodos que imponen restricciones conformaciones en la molécula proteinácea o sus análogos.

35 Ejemplos de modificaciones de cadena lateral contempladas por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tal como mediante alquilación reductora mediante reacción con un aldehído seguido por la reducción de NaBH₄; amidación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2, 4, 6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidrotálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por reducción con NaBH₄.

El grupo guanidina de residuos arginina se puede modificar mediante la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tal como 2,3-butanediona, fenilgloxal y glioal.

40 El grupo carboxilo se puede modificar mediante la activación de carbodiimida por medio de la formación de O-acilisourea seguido por la derivación posterior, por ejemplo, con una amida correspondiente.

45 Los grupos sulfhidrilo se pueden modificar mediante métodos tal como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación de ácido perfórmico con ácido cisteico; formación de disulfuros mezclados con otros compuestos tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercurio utilizando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato en pH alcalino.

Los residuos triptofan se pueden modificar mediante, por ejemplo, oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo indol con bromuro 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros sulfenilo. Los residuos tirosina por otra parte, se pueden alterar mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado 3-nitrotirosina.

50 La modificación del anillo imidazol de un residuo histidina se puede llevar a cabo mediante alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carbetoxilación con dietilpirocarbonato.

5

Ejemplos para incorporar aminoácidos y derivados no naturales durante la síntesis de péptido incluyen, pero no se limitan a, uso de norleucina, ácido 4-amino butírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienil alanina y/o los isómeros D de aminoácidos. Una lista de aminoácidos no naturales, contemplada aquí se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

No convencional	Código	No convencional	Código
aminoácido		aminoácido	
ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
aminociclopropano-	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
carboxilato		Ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
aminonorbonil-	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgln
carboxilato		Ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilhistidina	Nmhis
ciclopentilalanina	Cpen	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-alanina	Dal	L-N-metilleucina	Nmleu
D-arginina	Darg	L-N-metillisina	Nmlys
Ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-cisteína	Dcys	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-glutamina	Dgln	L-N-metilnorvalina	Nmnva
Ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmom
D-histidina	Dhis	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
D-leucina	Dleu	L-N-metilserina	Nmser
D-lisina	Dlys	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-metionina	Dmet	L-N-metilriptofan	Nmtrp
D-ortinina	Dom	L-N-metil tirosina	Nmtyr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metilvalina	Nmval
D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg

(continuación)

No convencional aminoácido	Código	No convencional aminoácido	Código
D-serina	Dser	L-N-metil-t-butylglicina	Nmtbug
D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-triptofan	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	α -metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	α -metil- γ -aminobutirato	Mgabv
D- α -metilalanina	Dmala	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilarginina	Dmarg	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metil-a-naftilalanina	Manap
D- α -metilaspartato	Dmasp	α -metilpenicillamina	Mpen
D- α -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D- α metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Nom
D- α metilisoleucina	Dmile	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
D- α -metilleucina	Dmleu	α -naftilalanina	Anap
D- α -metillisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletíl)glicina	Nglñ
D- α -metilortinina	Dmom	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D- α metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- α -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- α -metiltriptofan	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- α -metiltirosina	Dmty	N-ciclodecilglicina	Ncdec
D- α -metilvalina	Dmval	N-ciclododecilglicina	Ncdod
D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro

(continuación)

No convencional aminoácido	Código	No convencional aminoácido	Código
D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilaspártato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletíl)glicina	Nbhm
D-N-metilcisteína	Dnmcys	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metilglutamina	Dnmglñ	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilglutamate	Dnmglu	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil)glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazolietil)glicina	Nhis
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indolietil)glicina	Nhtrp
D-N-metilisina	Dnmlys	N-metil- γ -animobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmt
D-N-metilortinina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptofan	Dnmtrp	N-(1-metiletíl)glicina	Nval
D-N-metilrosina	Dnmtyr	N-metila-naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
Ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(p-hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L-t-butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil-t-butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletíl-glicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mglñ	L- α -metilglutamate	Mglu

(continuación)

No convencional aminoácido	Código	No convencional aminoácido	Código
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metilthioetil)glicina	Nmet
L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metillisina	Mlys
L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilortinina	Morn
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -metiltriptofan	Mtrp	L- α -metiltirosina	Mtyr
L- α -metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
N-(N-(2,2-difeniletíl) carbamilmetil)glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil) carbamilmetil)glicina	Nnbhe

1-carboxi-1-(2,2-difenil-Nmbc etilamino)

ciclopropano

5 Se pueden utilizar reticuladores, por ejemplo, para estabilizar las conformaciones 3D, utilizando reticuladores homofuncionales tal como los ésteres imido bifuncionales que tienen grupos espaciadores $(CH_2)_n$ con $n=1$ a $n=6$, glutaraldehído, ésteres N-hidroxisuccinimida y reactivos heterobifuncionales que contienen usualmente el grupo funcional reactivo amino tal como N-hidroxisuccinimida y otro grupo funcional reactivo específico de grupo tal como el grupo funcional maleimido o ditio (SH) o carbodiimida (COOH). Adicionalmente, los péptidos se pueden restringir conformacionalmente mediante y, por ejemplo, la incorporación de ácidos C α y N α -metilamino, introducción de enlaces dobles entre los átomos C α y C β de aminoácidos y la formación de péptidos cíclicos o análogos al introducir 10 enlaces covalentes tal como formar un enlace amida entre el terminal N y C, entre dos cadenas laterales o entre una cadena lateral y el terminal N o C.

En un anticuerpo monoclonal obtenido anteriormente se puede identificar la desinmunización mediante cualquier número de medios que incluye las etapas de:

15 (a) recubrir una superficie con un antígeno seleccionado del derivado de fibrina reticulada o el extracto que contiene el mismo o el producto de degradación de fibrinógeno;

(b) poner en contacto el antígeno en la etapa (a) con los anticuerpos monoclonales derivados del derivado reticulado de fibrina preparado como se describió anteriormente; y

(c) someter el complejo formado en la etapa (b) en una etapa de señal de amplificación.

20 De forma adecuada, en la etapa (a), se puede utilizar una placa de pozo en la cual los derivados de fibrina reticulada tal como el dímero D y/o el producto de degradación de fibrinógeno (preferiblemente obtenido de un procedimiento en donde el fibrinógeno se digiere adecuadamente con trombina para obtener el fragmento D, fragmento E y opcionalmente los fragmentos X y Y) se aplica a pozos individuales. Posteriormente, los anticuerpos monoclonales derivados de un derivado de fibrina reticulada luego se agrega a cada pozo. Una etapa de amplificación de señal apropiada que se puede aplicar es una etapa EIA en donde un conjugado de enzima apropiado se puede acoplar 25 con el complejo y el sustrato posteriormente agregado. Alternativamente, se pueden utilizar RIA, FIA, aglutinación, adherencia o quimioluminiscencia como etapas de amplificación de señal apropiadas.

El propósito del procedimiento de ensayo de detección denominado anteriormente es para asegurar que las células que se prueban producen anticuerpo específico para el derivado de fibrina reticulada relevante, pero no para el fragmento D.

- 5 Debe existir reacción mínima con fibrinógeno o productos de degradación de fibrinógeno y una reacción positiva con el derivado. El término "mínimo" no incluye reactividad pero se extiende a niveles basales tal como comparado con un anticuerpo dirigido a fibrinógeno per se. Posteriormente, una reacción mínima incluye reactividad subóptima comparado con un anticuerpo específico de fibrinógeno.

La presente invención también incluye dentro de su alcance un ensayo para detectar los derivados de fibrina ligados que incluyen las etapas de:

- 10 (1) poner en contacto un anticuerpo monoclonal específico a los derivados de fibrina reticulada pero no el fragmento D con una muestra biológica que se sospecha contiene un antígeno derivado de un derivado de fibrina reticulada o que comprende un derivado de fibrina reticulada per se; y
- (2) someter el complejo formado en la etapa (1) en una etapa de señal de amplificación.

- 15 En el ensayo mencionado anteriormente, el derivado de fibrina reticulada es adecuado para el dímero D, D2E o cualquier otro derivado de alto peso molecular como se describió anteriormente. El anticuerpo monoclonal se prepara como se describió previamente que es relevante para el derivado de fibrina reticulada particular que se ensaya.

La presencia del derivado de fibrina reticulada se puede utilizar como un auxiliar de diagnóstico adecuado para condiciones pretrombóticas, trombóticas u otras condiciones que involucran la formación y lisis de fibrina.

- 20 El anticuerpo monoclonal desinmunizado de la presente invención es particularmente útil para la formación de imágenes de coágulos sanguíneos así como también para objetivar coágulos de sangre con el fin de poner el coágulo en contacto con enzimas u otros agentes químicos capaces de disolver, completamente o parcialmente, el coágulo.

- 25 Con respecto a la formación de imágenes de coágulos, una molécula reportera se adhiere al anticuerpo monoclonal desinmunizado o a un anticuerpo que tiene especificidad para el anticuerpo desinmunizado o una porción o conjugado del mismo y este luego se introduce a un anfitrión, tal como un humano. Al detectar la molécula reportera, se pueden visualizar los coágulos de sangre. Una forma particularmente útil de molécula reportera es una etiqueta nuclear. Las etiquetas nucleares contempladas para uso en la presente invención incluyen pero no se limitan a un quelato de ión de metal bifuncional. El quelato se puede adherir al anticuerpo en sí mismo o múltiples quelatos se pueden adherir a la proteína por medio de dendrímeros. Particularmente se prefieren etiquetas nucleares ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{97}Ru , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{188}Re . La etiqueta nuclear más preferida es ^{99m}Tc . Preferiblemente, el anfitrión es un humano y, por lo tanto, es necesario para el anticuerpo monoclonal de murino 3B6 a ser desinmunizado.
- 30

- 35 Las formas alternativas de inmunoscintigrafía se puede obtener utilizando isótopos tal como un isótopo ^{68}Ga o ^{124}I u otros isótopos PET. Tal tecnología se puede describir como "inmuno-PET". La tecnología tiene ventajas sobre cintigrafía de cámara y y puede proporcionar imágenes de alta resolución de coágulos de sangre especialmente en áreas del cuerpo menos agradable a medios diagnósticos convencionales tal como pulmones o coágulos pequeños en la pantorrilla o pelvis.

- 40 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una molécula de conjugado que comprende una molécula desinmunizada inmunoreactiva tal como un anticuerpo desinmunizado y uno o ambas de una etiqueta de formación de imágenes o un agente terapéutico.

Las etiquetas de formación de imágenes preferidas son etiquetas tipo MRI-, ultrasonido- y/o CT tal como pero no limitado a ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{97}Ru , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{188}Re .

- 45 Las etiquetas terapéuticas incluyen citoquinas, agentes anticoagulantes, agentes de reparación de heridas y agentes antiinfección.

- Otro aspecto de la presente invención contempla un método para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano, dicho método comprende introducir en dicho paciente una forma desinmunizada del anticuerpo monoclonal 3B6 de murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo marcado con una molécula reportera que permite la diseminación del anticuerpo marcado a través del sistema circulatorio y luego someter dicho paciente para reportar el medio de detección de molécula para identificar la localización del anticuerpo en un coágulo.
- 50

Preferiblemente, la molécula reportera es un etiqueta nuclear.

Preferiblemente, la etiqueta nuclear es ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{97}Ru , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{188}Re .

Preferiblemente, la etiqueta nuclear es ^{99m}Tc .

5 La presente invención contempla adicionalmente el uso de un anticuerpo monoclonal de murino desimmunizado específico para el dímero D u otro derivado de fibrina reticulada en la fabricación del agente de formación de imágenes de coágulo.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal de murino es 3B6 o un homólogo del mismo.

Preferiblemente, la etiqueta de formación de imágenes de coágulo es para uso en humanos.

10 El mismo anticuerpo también puede llevar múltiples etiquetas tal como múltiples agentes anti-coagulantes y/o moléculas reporteras. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden administrar múltiples anticuerpos cada uno llevado a cabo en una etiqueta diferente.

Se puede utilizar el anticuerpo objetivo de coágulo presente solo o en combinación con otros protocolos de formación de imágenes. Un tal protocolo es formación de imagen plana tal como pero no limitado a CT, MRI o ultrasonido.

15 De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la presente invención contempla un método para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano, dicho método comprende introducir en dicho paciente una forma desimmunizada del anticuerpo monoclonal 3B6 de murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo marcado con una molécula reportera que permite la diseminación del anticuerpo marcado a través del sistema circulatorio y luego someter dicho paciente a formación de imágenes de coágulo planas.

20 Preferiblemente, la formación de imagen plana es MRI o exploración CT. Se puede utilizar ultrasonido en el proceso de formación de imágenes.

25 De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la presente invención contempla un método para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano, dicho método comprende introducir en dicho paciente una forma desimmunizada del anticuerpo monoclonal 3B6 de murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo marcado con una molécula reportera que permite la diseminación del anticuerpo marcado a través del sistema circulatorio y luego someter dicho paciente a una exploración de medicina nuclear tomográfica asistida por computador para visualizar el coágulo.

Preferiblemente, la molécula reportera es una etiqueta nuclear.

Preferiblemente, la etiqueta nuclear es ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{97}Ru , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{188}Re .

Preferiblemente, la etiqueta nuclear es ^{99m}Tc .

30 Los agentes de formación de imágenes de coágulo de la presente invención también son útiles como agentes terapéuticos. En particular, los agentes objetivos de coágulo se fusionan, se unen o de otra forma se asocian con una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos tal como una molécula anticoagulante. De acuerdo con lo anterior, otro aspecto de la presente invención contempla un método para facilitar la disolución o remoción de un coágulo de sangre en un humano, dicho método comprende administrar a dicho humano una disolución del coágulo o cantidad efectiva de prevención del crecimiento de coágulos de un anticuerpo monoclonal derivado de murino variante que tiene especificidad para el dímero D derivado de humano y otros derivados de fibrina reticulada y sin reactividad con fibrinógeno o productos de degradación de fibrinógeno inclusive de los fragmentos D y E en donde dicho anticuerpo monoclonal derivado de murino variante es sustancialmente no inmunogénico en un humano en donde dicho anticuerpo monoclonal comprende adicionalmente una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos fusionados, unidos o de otra forma asociados a esto.

45 Todavía otro aspecto de la presente invención se dirige al uso de un anticuerpo monoclonal derivado de murino variante que tiene especificidad para el dímero D derivado de humano y otros derivados de fibrina reticulada y sin reactividad con fibrinógeno o productos de degradación de fibrinógeno inclusive de los fragmentos D y E en donde dicho anticuerpo monoclonal derivado de murino variante es sustancialmente no inmunogénico en un humano y dicho anticuerpo comprende adicionalmente una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos fusionado, unido o de otra forma adherido al mismo en la fabricación de un medicamento para la disolución de un coágulo de sangre en un humano.

En una realización alternativa, se pueden utilizar múltiples anticuerpos desinmunizados. En un ejemplo, un anticuerpo desinmunizado 3B6 se administra solo y luego los anticuerpos de anti-inmunoglobulina desinmunizados cada uno lleva a cabo un agente tal como un agente terapéutico o diagnóstico que objetivará un complejo de un coágulo-3B6. Todavía otra alternativa es anticuerpos construidos por ingeniería con múltiples (por ejemplo bi-) especificidades. En este caso, una especificidad puede estar en el coágulo y otra en el sitio del coágulo (por ejemplo en un receptor celular). Esto también se puede llevar a cabo utilizando múltiples anticuerpos.

La presente invención contempla adicionalmente composiciones que comprenden los agentes objetivos de coágulo de la presente invención y uno o más portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Las formas farmacéuticas adecuada para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles así como también como formas liofilizadas de preparaciones de anticuerpo junto con agentes estabilizantes tal como azúcar, proteínas u otros compuestos o moléculas que facilitan el proceso de radiomarcado. Esto puede ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se puede preservar contra la acción contaminante de los microorganismos tal como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio de dilución o disolvente que comprende, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), sus mezclas adecuadas y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de tensoactivos. Las prevenciones de la acción de microorganismos se pueden traer aproximadamente mediante varios agentes anti-bacterianos y anti-fúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tirmerosal y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede traer aproximadamente mediante el uso en las composiciones de agentes de retraso de absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles al incorporar los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con el ingrediente activo y opcionalmente otros ingredientes activos según se requiera, seguido por esterilización filtrada u otro medio apropiado de esterilización.

Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimiento, agentes antibacterianos y agentes antifúngicos, agentes que retrasan la absorción e isotónicos y similares. El uso de tales medios y agentes para la sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica y excepto de cualquier medio convencional o agente es incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Los agentes que objetivan el coágulo de la presente invención son útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de condiciones asociadas a trombina tal como DVT, PE y DIC.

Todavía otro aspecto de la presente invención contempla un método para tratar un sujeto con cáncer asociado con fibrina. En esta realización, los anticuerpo para el epítipo del dímero D se puede utilizar para suministrar agentes citotóxicos tal como un isótopo que emite β o γ o sus combinaciones. Tales isótopos incluyen pero no se limitan a ^{131}I , itrio-90, renio-186, renio-188, lutetio-117 y cobre-67. La fibrina asociada con un cáncer incluye un tumor encapsulado de fibrina.

Las moléculas inmunoreactivas desinmunizadas de la presente invención son, por lo tanto, portadores para cualesquier agentes de unión a coágulo o agentes de disolución de coágulo o para cualesquier agentes que tiene propiedades terapéuticas o diagnósticas útiles. Las moléculas inmunoreactivas desinmunizadas de la presente invención son también útiles para determinar las cinéticas de disolución de coágulos, disipación y/o desaparición. Una esta información está disponible, la disolución de coágulo o agentes formadores de imagen se pueden administrar muy rápidamente.

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Fusión celular y selección de híbridos

Los bazos se remueven asépticamente de 2 ratones inmunizados muertos por dislocación cervical tres días después de una inyección del dímero D. Previamente, los ratones se han inmunizado con tres inyecciones de lisato de fibrina digerido con trombina de enzimas proteolíticas y plasmina como se reporta en la referencia de Graeff y Hafter anteriormente mencionada. Se colocan dos bazos en un plato de Petri de 60 mm (Falcon, 3001, Oxnard, Calif.) que contiene 5 ml de medio completo (85% de RPMI 1640, 15% p/v de suero de becerro fetal, 100 I.U./ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 2×10^{-3} M de glutamina; Gibco, Grand Island, N.Y.). Se prepara una suspensión

celular al desencapsular el bazo con agujas calibre 2 x 18 adheridas a jeringas desechables de 3 ml con el último cm con la punta inclinada en un ángulo de 60°. La suspensión celular luego se aspira en una jeringa de 10 ml provista con una aguja calibre 22 y se eyecta con presión moderada. Esta operación se desarrolla dos veces antes de filtrar las células en un tubo Falcon 2001 a través de un tamiz en acero inoxidable de malla fina para remover residuos y grandes grupos de células.

A la suspensión celular se le permite reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir que grupos pequeños y fragmentos de membrana se decanten antes de transferir la suspensión celular a un tubo Falcon 2001 fresco. Las células se centrifugan a 350G durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se decanta del primer glóbulo celular en un tubo fresco y gira a 700G durante cinco minutos para dar un segundo glóbulo celular y los dos glóbulos se agrupan y se resuspenden en 5 ml de medio completo. Los glóbulos blancos del bazo (SWBC) luego se cuentan y su viabilidad se estima mediante cepas azules Turks y Trypan, respectivamente, y se colocan 100×10^6 SWBC viables en tubos Falcon 2001 separados en un volumen total de 5 ml de medio completo. Las células de mieloma NS-1 a ser utilizadas para fusión, se lavan una vez mediante centrifugación a 380G durante 15 minutos a temperatura ambiente y se ajusta a 5×10^6 células viables /ml en medio completo.

Se mezclan veinticinco $\times 10^6$ NS-1 y 100×10^5 SWBC inmunes y se hacen girar 350G durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decanta, el medio restante se remueve cuidadosamente con una pipeta Pasteur y 2 ml de una solución de 42% p/v de polietilenglicol (PEG, MW1540) (Baker Chemical Co., New Jersey). En RPMI 1640 que contiene 15% v/v de dimetil sulfoxido (DMSO) a 37°C se agrega con una pipeta desechable de vidrio de 5 ml (Corning Glass, Coming, NY) y las células se resuspenden con la misma pipeta a 5 ml durante 30 segundos con la ayuda de pipetadora eléctrica (Pipet-aid Drummond Scientific Co., Broomall, PA). A la suspensión celular PEG se le permite reposar durante 30 segundos adicionales a temperatura ambiente antes de agregar 5 ml de medio completo, en forma de gotas, con una pipeta Pasteur, durante un periodo de 90 segundos con agitación constante del tubo, suficiente para asegurar la mezcla completa con la solución de PEG viscosa. Se agrega inmediatamente 5 ml de medio completo y se mezcla mediante inversión y a la suspensión celular se le permite reposar durante 150 segundos a temperatura ambiente antes de centrifugación a 350G durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decanta y el glóbulo celular se resuspende gentilmente en 5 ml de medio completo utilizando una pipeta de 5 ml con pipeteador eléctrico; se toma extremo cuidado para no romper todos los grupos celulares. Utilizando un repetidor Tridak (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ), 0.05 ml de la suspensión celular se agrega a cada pozo de 4 Costar de placas de 24 pozos (Costar 3524, Cambridge, Mass.) que contiene 1×10^6 BALB/c de ratón SWBC normal como células alimentadoras en 1 ml de medio completo que contiene 10^{-4} M de Hipoxantina (Sigma), 4×10^{-7} M de Aminopterina (Sigma), 1.6×10^{-5} M de Timidina (Sigma) y 4×10^{-5} M de 2-Mercaptoetanol (medio HAT), denominado de aquí en adelante como primeras placas de fusión.

Las primeras placas de fusión luego se colocan en atmósfera humidificada al 95% de 5% de CO₂ a 37°C. Las células primero se cargan en los días 5 o 7 y de ahí en adelante cuando sea necesario, con 0.5 ml de HAT fresco. De manera general, en el día 10, 0.5 ml del medio se remueve para el ensayo de detección de cada pozo que muestra el crecimiento de hibridoma y se reemplaza 0.5 ml de medio HAT fresco. Un número de los pozos de crecimiento más fuertes se selecciona para mantenimiento en la base del ensayo de detección. Los pozos seleccionados se les permite crecer en confluencia en el pozo original (1er pozo), luego cada uno se divide a la mutad y se transfiere a un pozo fresco (2do pozo) de una placa Costar de 24 pozos (2da placa). Los pozos se chequean diariamente y se expandan en un segundo, tercer o cuarto pozo de la segunda placa Costar cuando sea necesario. De los días 14-28, se cargan células con medio HT. Cuando existe crecimiento fuere en por lo menos dos pozos de la segunda placa, el sobrenadante de un pozo de cada clonotipo se selecciona para volver a detectar y un número de clonotipos que producen anticuerpos específicos se seleccionan de los resultados del segundo ensayo de detección para producir el anticuerpo monoclonal que secreta las estirpes celulares mediante dilución limitante.

EJEMPLO 2

Clonación de hibridomas

Un segundo pozo de cada clonotipo seleccionado se resuspende y el número de células viables por pozo se estima mediante la exclusión de Trypan blue. Inmediatamente antes de colocar en placas cada clonotipo, se hacen series relevantes de diluciones en medio HT o medio completo (si las células son más viejas de 28 días post fusión) para dar una frecuencia de 0.5 células/0.05 ml. Este volumen luego se agrega con un Repetidor Tridak a cada pozo de una placa de cultivo de tejido de fondo redondo plano de 96 pozos (Flow Laboratories, Mississauga, Ontario, Canadá) (placa LD) que contiene 1×10^5 células cargadas de bazo de ratón normales en 0.1 ml de HT o medio completo. Las placas LD luego se colocan en atmósfera de 95% de aire, 5% de CO₂, humidificada a 37°C y se detecta para crecimiento clonal 7-10 días después. De cada pozo de crecimiento positivo, se remueve 0.1 ml de sobrenadante para detección y estos pozos se cargan para el primer tiempo con 0.1-0.15 ml de medio HT o medio completo. En la base del ensayo de detección LD, un mínimo de dos de los clones que producen anticuerpos específicos "mejores" se seleccionan finalmente para expansión en cultivo de masa.

Alternativamente, si se desea obtener una gran cantidad de Mab, a los ratones BALB/c hembra se les da una inyección intraperitoneal de 0, 5 ml 2, 5, 10, 14, tetrametilpentadecano (Pristane, Aldrich Chemical Corp., Milwaukee, Wisconsin) 14 días antes de la inyección de 2×10^6 células de hibridoma viable y fluidos de ascitis se recolectan de ratones 12-14 días después de la inyección de las células. El fluido ascítico se clarifica mediante centrifugación y el MAb se recupera mediante precipitación con 45% de sulfato de amonio y se almacena a 4°C o -70°C en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contiene 0.01% de azida de sodio.

EJEMPLO 3

Ensayo de detección de anticuerpo monoclonal

Los pozos de una placa microtest con fondo de U de 96 pozos (Disposable Products Pty. Ltd., Adelaide, South Australia) se cubren al agregar 50 μ l del dímero D (5 μ g/ml) o Productos de degradación de fibrinógeno (5 μ g/ml en PBS durante una hora a temperatura ambiente (25°C). El exceso de antígeno se remueve al invertir y sacudir la placa y la placa luego se lava tres veces con PBS que contiene 0.05% w/v de Tween 20 (Sigma Chemical Corp., St Louis, Missouri). Los clones que secretan MAb en el dímero D o los productos de degradación de fibrinógeno luego se detectan al agregar 50 μ l del sobrenadante de cultivo de tejido a cada pozo e incubar durante una hora a temperatura ambiente. El MAb no unido se remueve mediante inversión y sacudir y la placa se lava tres veces con PBS/Tween. Cien μ l de una dilución 1/1000 de inmunoglobulina antiratón de conejo conjugada con peroxidasa (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) en PBS/Tween se agrega y se le permite incubar una hora adicional a temperatura ambiente. La placa se invierte de nuevo y se lava tres veces con PBS/Tween y 100 μ l del sustrato activado (inmediatamente antes de uso, 10 μ l de 3% de solución de peróxido de hidrógeno se agrega a 10 ml de una solución de sustrato que contiene 50 mM de citrato, 2.5 mM de diclorhidrato de 0-tolidina (0-tolidina, Sigma Chemical Co., recristalizado de HCl diluido) 0.025 mM de EDTA pH 4.5) se agrega a cada pozo. La reacción de color se detiene después de 10 minutos mediante la adición de 50 μ l de 3M de HCl que origina un cambio de color de azul a amarillo y la absorbancia se registra a 450 nm en un Titertek multiskan.

EJEMPLO 4

25 Identificación de secuencias de región variable 3B6

El hibridoma murino 3B6 se propaga en medio RPMI 1640 complementado con 15% w/v de suero de becerro fetal. El ARN total se prepara de 10^7 células de hibridoma. Se prepara cADN de V_H y V_K utilizando transcriptasa inversa y los cebadores de región constante IgG de ratón y la región constante κ de ratón. El primer cADN de cepa se amplifica mediante PCR utilizando una variedad de cebadores de secuencia de señal de ratón (6 conjuntos para V_H y 7 conjuntos para V_K). Los ADN amplificados se purifican en gel y se clonan dentro del vector pGem® T Easy (Promega). Los clones V_H y V_K obtenidos se detectan para insertos del tamaño esperado mediante PCR y la secuencia de ADN de los clones seleccionados determinados mediante el método de terminación de cadena dideoxi. Los genes V_H y V_K productivos se identifican mediante análisis de secuencia. La localización de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se determina con referencia a otras secuencias de anticuerpo (43). El 3B6 V_H se puede asignar al subgrupo IA de cadenas pesadas de ratón. El 3B6 V_K se puede asignar al subgrupo I de cadenas κ de ratón.

EJEMPLO 5

Análisis de las secuencias de región variable 3B6 (v) con epítomos de célula T potenciales

Las secuencias 3B6 V_H y V_K se analizan para la presencia de epítomos de células T potenciales utilizando los procedimientos descritos previamente (Carr et al., Publicación de Patente Internacional No. WO 98/52976). Los péptidos identificados como epítomos de célula T potenciales (péptido de unión MHC clase II) se modifican en sílice y la secuencia modificada se vuelve a analizar para asegurar la pérdida de unión potencial MHC clase II y verificar que los motivos de unión MHC clase II que no se han generado en la secuencia circundante. Alternativamente, la secuencia se modifica para convertir el motivo de unión MHC clase II en uno encontrado en una línea germinal humana. Solo, de manera general las sustituciones de aminoácido conservadoras se prueban y las sustituciones hechas con respecto a la estructura de anticuerpo general. Un número de secuencias variantes se compila para el V_H y V_K , cada uno contiene diferentes números de sustituciones.

EJEMPLO 6

50 Designados de secuencias de regiones variables 3B6 variantes (v) con números reducidos de epítomos de célula T potenciales

Las regiones pesada y liviana (v) designadas de acuerdo con el esquema del Ejemplo 5 se construyen in vitro mediante el método de recombinación PCR traslapante descrito (Daugherty et al., Nucleic Acids Research 19: 2471-2476, 1991). Se utilizan genes V_H y V_K de murino clonados como plantillas para mutagenie de las regiones de estructura en las secuencias humanizadas requeridas. Se sintetizan conjuntos de pares de cebador mutagénico que abarcan las regiones a ser alteradas. Los cebadores adyacentes incluyen 15 bp de la secuencia homóloga. Una primera ronda de PCR utilizando estos cebadores produce 5 a 8 fragmentos de ADN traslapante que abarcan el gen de la región asignada (v). Los vectores V_H -PCR1 y V_K -PCR1 (Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837, 1989) se utilizan como plantillas para introducir la secuencia de flanqueo 5' que incluye el péptido de señal líder, el intrón líder y el promotor de inmunoglobulina de murino, y la secuencia de flanqueo 3' que incluye el sitio de división y las secuencias de intrón, en dos fragmentos traslapantes adicionales. Los fragmentos de ADN se combinan en una segunda ronda de PCR utilizando cebadores de flanqueo externos para obtener los productos PCR de la longitud completa requerida. Estos productos PCR se clonan en el vector pUC19 para la determinación de la secuencia de ADN. Se seleccionan clones que contienen las alteraciones de secuencia esperadas y la secuencia de ADN completa se confirma que es correcta para cada V_H y V_K deseado. Los genes de cadena liviana y pesada se transfieren a los vectores de expresión pSVgpt y pSV hyg con IgG1 humano o las regiones constantes k como se describe (Tempest et al., Biotechnology 9: 266-271, 1991). Los vectores V_H -PCR1 y V_K -PCR1 (Orlandi et al., 1989, supra) se utilizan como plantillas para introducir la secuencia de flanqueo 5' que incluye el péptido de señal líder, el intrón líder y el promotor de inmunoglobulina de murino, y la secuencia de flanqueo 3' que incluye el sitio de división y las secuencias de intrón.

20 EJEMPLO 7

Expresión y purificación de los anticuerpos 3B6 variantes

Los vectores de expresión de cadena liviana y pesada 3B6 variantes se cotransfectan en diferentes combinaciones mediante electroporación en NS0, un mieloma de ratón que no produce inmunoglobulina, obtenido de la Colección Europea de Cultivos Celulares de Animal, Porton, U.K. (ECACC No 85110505). Las colonias que expresan el gen gpt se seleccionan en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con 0.8 µg/ml de ácido micofenólico y 250 µg/ml de xantina. La producción de un anticuerpo humano mediante clones celulares transfectados se mide mediante ELISA para el IgG humano (48). Se seleccionan Las estirpes celulares que secretan el anticuerpo y se expanden. Los anticuerpos 3B6 variantes se purifican utilizando Prosep®-A (Bioprocessing Ltd, Conset, U.K.).

30 EJEMPLO 8

Prueba funcional de anticuerpos variantes 3B6

Se prueban los anticuerpos variantes para la unión del dímero D utilizando ensayos con base en ELISA ampliamente como se describe en el Ejemplo 3. La especificidad de unión se confirma utilizando el ensayo de fibrinógeno humano. En una realización preferida, sin embargo, el dímero D se utiliza en la fase de solución. En este ensayo, los anticuerpos 3B6 se cubren en la placa ELISA en 0.5 µg/pozo, para capturar el dímero D en la solución. El dímero D se aplica a 10 µg/ml (500 ng/pozo) y diluciones dobles. El anticuerpo revelador es anti-D monoclonal de ratón conjugado HRPO (Dimertest EIA Tag; Agen) y los resultados se desarrollan mediante el sustrato OPD y se leen en 492 nm. Los anticuerpos desinmunizados 3B6 se comparan con los anticuerpos 3B6 de murino y quiméricos y el anticuerpo desinmunizado 3B6 conducido previamente DIVH1/DIVK1. Los resultados se muestran en las Figuras 4A, 4B y 4C. El uso del dímero D de la fase de solución prueba ser mejor que la fase sólida del dímero D en la selección de clones y es un aspecto preferido de la presente invención.

EJEMPLO 9

Visualización de trombos utilizando 3B6-99mTc

El anticuerpo monoclonal 3B6 de ratones y desinmunizado forman para humanos se representa en la figura 1A y exhibe especificidad para fibrina que es una parte principal de coágulos de sangre (Figura 1B). El concepto de formación de imágenes de coágulo se desarrolla al marcar el anticuerpo monoclonal 3B6 con una etiqueta nuclear, en este caso, ^{99m}Tc (Figura 2). La administración del anticuerpo monoclonal desinmunizado 3B6 marcado en humanos (figura 3A). La visualización de los coágulos en el sistema circulatorio tal como coágulos de sangre en en la parte anterior de los muslos (Figura 3B) ocurre mediante la unión del anticuerpo monoclonal a fibrina que resulta en la concentración de la radiación en el sitio del coágulo.

EJEMPLO 10

Visualización de trombos utilizando 3B6-99mTc

5 Se crean émbolos pulmonares (0.1-0.5 g) en perros anestesiados mediante embolización de trombos desarrollados hechos mediante la infusión de trombina y el fibrinógeno humano a través de los catéteres de balón puestos en las venas femorales. Los fragmentos Fab' purificados (0.35 mg) de un derivado quimérico (humano/murino) de un anticuerpo monoclonal específico de fibrina se marcan con un 15 mCi de ^{99m}Tc. Una hora después de embolización, la preparación del anticuerpo radiomarcado se inyecta a través de un catéter intravenoso periférico. Ocho horas después de la inyección del anticuerpo, se desarrollan exploraciones de formación de imágenes para visualizar los émbolos.

10 Los fragmentos de anticuerpo marcados ^{99m}Tc extraídos de la circulación con un t1/2 de una hora para ambos sujetos. En el sujeto 1, son visibles dos émbolos pequeños en el lóbulo inferior derecho (masa combinada, 0.187 g). La relación de radioactividad de coágulo/sangre es 38:1. En el sujeto 2, una embolia en el lóbulo inferior derecho (masa, 0.449 g) es visible. La relación de radioactividad coágulo/sangre es 27: 2. Una embolia pequeña (0.091 g) en el ventrículo derecho del sujeto 1. La relación de radioactividad coágulo/sangre es 45: 1. No se notan efectos adversos de administración de anticuerpo o metodología de exploración.

15 La infusión de los fragmentos de anticuerpo antifibrina radiomarcados seguido por las imágenes que producen imágenes de émbolo, aún émbolos relativamente pequeños en la periferia del pulmón. Las imágenes son confiables y requieren entrenamiento mínimo para interpretación. La técnica se puede utilizar para imágenes de trombos de vena profunda en el mismo conjunto. Este agente es bien tolerado por los sujetos. No hay necesidad de aguantar la respiración o la sincronización cardíaca. Este uso no es nefrotóxico del tinte de contraste intravenoso. La dosis de radiación es similar a la dosis utilizada para las exploraciones de ventilación/perfusión. Esta tecnología puede simplificar y clarificar el diagnóstico de PE y DVT, utilizando tecnología disponible en la mayoría de centros médicos.

Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes a aquellas descritas específicamente. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y los compuestos denominados o indicados en esta especificación, individualmente o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualquiera dos o más de dichas etapas o características.

25 BIBLIOGRAFÍA

Adams et al., Cancer Res. 53: 4026-4034, 1993.

Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. 1997.

Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15. Budzynski et al., Blood 54(4), 1979.

30 Carr et al. (Publicación de Patente Internacional No. WO 98/52976).

Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901, 1987.

Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799, 1992. Chou et al. (Patente Estadounidense No. 6,056,957).

Coligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 1991-1997.

Cumber et al., J. Immunol. 149: 120-126, 1992.

35 Daugherty et al., Nucleic Acids Research 19: 2471-2476, 1991.

Davies & Riechmann, FEBS Lett. 339: 285-290, 1994.

Publicación de Patente Europea No. 0 239 400.

Gefter et al., Somatic Cell Genet. 3: 231-236, 1977.

Glockshuber et al., Biochem. 29: 1363-1367, 1990.

40 Graeff y Halfer, "Detection y Relevance of Fibrina reticulada Derivatives in Blood", Seminars in Thrombosis y Hemostatis 8(1), 1982.

Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448, 1993. Jones et al., Nature 321: 522-525, 1986.

- Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Department of Health y Human Services, 1983.
- Kennet et al. (eds) Monoclonal Antibodies y Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, pp. 376-384, Plenum Press, New York, 1980.
- Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6(7): 511-519, 1976.
- 5 Kohler y Milstein, Nature 256: 495-499, 1975.
- Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553, 1992.
- Kozbor et al., Methods in Enzymology 121: 140, 1986.
- Krebber et al., J. Immunol. Methods 201 (1): 35-55, 1997.
- Ku & Schutz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552-6556, 1995.
- 10 Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987.
- Morgan et al. (Patente Estadounidense No. 6,180,377).
- Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837, 1989.
- Plückthun et al., In Antibody engineering: A practical approach 203-252, 1996.
- Plünckthun, Biochem. 31: 1579-1584, 1992.
- 15 Queen et al. (Patente Estadounidense No. 6,180,370).
- Reiter et al., Biochem. 33: 5451-5459, 1994. Reiter et al., Cancer Res. 54: 2714-2718, 1994.
- Reiter et al., J. Biol. Chem. 269: 18327-18331, 1994.
- Riechmann et al., Nature 332: 323-327, 1988.
- Shulman et al., Nature 276: 269-270, 1978;
- 20 Tempest et al., Biotechnology 9: 266-271, 1991.
- Toyama et al., "Monoclonal Antibody, Experiment Manual", publicado por Kodansha Scientific, 1987.
- Trowbridge, J. Exp. Med. 148(1): 313-323, 1978.
- Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536, 1988.
- Volk et al., J. Virol. 42(1): 220-227, 1982.
- 25 Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989.
- Webber et al., Mol. Immunol. 32: 249-258, 1995.
- Willner et al., Biochemistry 21: 2687-2692, 1982.
- Winter y Milstein, Nature 349: 293, 1991,
- LISTADO DE SECUENCIAS
- 30 <110> Agen Biomedical Limited (todos los Estados designados excepto Estados Unidos) Carr, Francis (solo Estados Unidos) Hamilton, Anita (solo Estados Unidos)

<120> Moléculas portadoras

<130> 2537681/EJH

<140> Internacional

<141> 2000-06-26

5 <150> US 60/301,154

<151> 2001-06-26

<150> US 60/300,947

<151> 2001-06-27

<160> 12

10 <170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> péptido

15 <220>

<221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> 3B6DIVHv5

<400> 1

```

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

20

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> péptido

5 <220>

<221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> 3B6DIVHv6

<400> 2

```

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

```

10

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> péptido

15 <220>

<221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> 3B6DIVHv7

<400> 3

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

<210> 4

<211> 107

5 <212> PRT

<213> péptido

<220>

<221> misc_feature

<222> () .. ()

10 <223> 3B6DIVKv1

<400> 4

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

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> péptido

<220>

5 <221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> 3B6DIVKv4

<400> 5

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

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

Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Ser	Thr	Ser	Thr	Arg	Tyr	Pro	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50					55					60				

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

Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Leu	Lys
			100					105		

10 <210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> péptido

<220>

15 <221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> 3B6DIVKv7

<400> 6

ES 2 365 004 T3

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

<210> 7

<211> 354

<212> ADN

5 <213> anticuerpo

<220>

<221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> 3B6DIVHv5

10 <400> 7

gatgtgcagc ttaaggagtc gggacctggc ctgggttaaac ctactcagac tctgaccctc 60
 acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatacggcag 120
 ccaccaggaa agggactgga gtggatgggc tacataacct acagtgggtac cactagctac 180
 aaccatctc tcacaagtcg aatctctatc tctcgcgaca catccaagaa ccagttcttc 240
 ctgcagttga attctctgac ttctgaggac acagccacat attactgtgc aagagagtgg 300
 tttccttact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ttca 354

<210> 8

<211> 354

<212> ADN

15 <213> anticuerpo

<220>

<221> misc_feature

<222> () .. ()

<223> 3B6DIVHv6

<400> 8

```
gatgtgcagc ttaaggagtc gggacctggc ctggttaaac ctactcagac tctgaccctc    60
acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatacggcag    120
ccaccaggaa agggactgga gtggatgggc tacataacct acagtgggtac cactagctac    180
aaccatctc tcacaagtcg aatctctatc tctcgcgaca catccaagaa ccagttcttc    240
ctgcagttga attctgtgac ttctgaggac acagccacat attactgtgc aagagagtgg    300
tttccttact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ttca        354
```

<210> 9

5 <211> 354

<212> ADN

<213> anticuerpo

<220>

<221> misc_feature

10 <222> () .. ()

<223> 3B6DIVHv7

<400> 9

```
gatgtgcagc ttaaggagtc gggacctggc ctggttaaac ctactcagac tctgaccctc    60
acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatacggcag    120
tttccaggaa aaaaactgga gtggatgggc tacataacct acagtgggtac cactagctac    180
aaccatctc tcacaagtcg aatctctatc tctcgcgaca catccaagaa ccagttcttc    240
ctgcagttga attctgtgac ttctgaggac acagccacat attactgtgc aagagagtgg    300
tttccttact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ttca        354
```

<210> 10

15 <211> 321

<212> ADN

<213> anticuerpo

<220>

<221> misc_feature

20 <222> ()..()

<223> 3B6DIVKv1

<400> 10

```

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaatcc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      60
atctcctgca aggccagtca gaatgtgggt actcctgtag cctggatca gcagaaacca      120
gaacaatctc ctaaacttct gatttactcg acatccactc ggtaccctgg agtcctgat      180
cgcttactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tctgcaggct      240
gaagacgtgg cagattatct ctgccagcaa tatagcctct atcctctcac gttcgggtgct      300
gggaccaagg tggagctgaa a                                             321
    
```

<210> 11

5 <211> 321

<212> ADN

<213> anticuerpo

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (..)()

<223> 3B6DIVKv4

<400> 11

```

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaatcc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      60
atctcctgca aggccagtca gaatgtgggt actcctgtag cctggatca gcagaaacca      120
gaacaatctc ctaaacttct gatttactcg acatccactc ggtaccctgg agtcctgat      180
cgcttactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tctgcagtct      240
gaagacctgg cagattatct ctgccagcaa tatagcctct atcctctcac gttcgggtgct      300
gggaccaagg tggagctgaa a                                             321
    
```

<210> 12

15 <211> 321

<212> ADN

<213> anticuerpo

<220>

<221> misc_feature

20 <222> () .. ()

<223> 3B6DIVKv7

ES 2 365 004 T3

<400> 12

```
gacattgtga tgaccagtc tcaaaaatcc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      60
atctcctgca aggccagtca gaatgtgggt actcctgtag cctggatca gcagaaacca      120
gaacaatctc ctaaacttet gatttactcg acatccaactc ggtaccctgg agtcctgat      180
cgcttcaactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tctgcaggct      240
gaagacgtgg cagattattt ctgccagcaa tatagcctct atcctctcac gttcggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa a                                          321
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo desinmunizado o fragmento de anticuerpo desinmunizado específico para un epítipo en el dímero D humano que reconoce la fibrina reticulada pero no el fibrinógeno, en donde uno o más residuos de aminoácido en el dominio variable (v) de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo mutan para eliminar o reducir la asociación de fragmentos de péptido de dicho dominio v con las moléculas MHC clase II, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una combinación de dominios v de cadena H y L que comprende una combinación de secuencias de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste de:
- 5
- SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 5.
- 10
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo desinmunizado de la reivindicación 1 en donde dicho anticuerpo o fragmento es específico para un epítipo reconocido por el anticuerpo 3B6 monoclonal de murino anti-fibrina.
3. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 en donde dicho anticuerpo se marca con una molécula reportera para la fabricación de un agente formador de imágenes para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano en donde en la introducción de dicho anticuerpo en dicho paciente a dicho anticuerpo marcado se le permite diseminarse a través del sistema circulatorio y en donde el paciente se somete a un protocolo de formación de imágenes para visualizar el coágulo.
- 15
4. El uso de la reivindicación 3 en donde dicho protocolo de formación de imágenes es MRI, exploración CT, ultrasonido o exploración de medicina nuclear tomográfica asistida por computador que incluye Cámara de gammagrafía gama o PET.
- 20
5. El uso de la reivindicación 3 en donde dicha molécula reportera es una etiqueta nuclear.
6. El uso de la reivindicación 5 en donde dicha etiqueta nuclear es ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{97}Ru , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I o ^{188}Re .
7. El uso de la reivindicación 6 en donde dicha etiqueta nuclear es ^{99m}Tc .
- 25
8. Uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpos de la reivindicación 1 o 2 para la fabricación de un medicamento para facilitar la disolución, prevención de crecimiento o remoción de un coágulo de sangre en un humano en donde dicho anticuerpo comprende adicionalmente una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos fusionados, unidos o de otra forma asociados a esto.
9. Un conjugado que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 y una o ambas de una etiqueta de formación de imágenes y/o un agente terapéutico.
- 30
10. El conjugado de la reivindicación 9 en donde dicha etiqueta formadora de imágenes es un MRI-, ultrasonido-, CT-, o medicina nuclear (que incluye cintigrafía de cámara gama y etiqueta tipo PET).
11. El conjugado de la reivindicación 10 en donde dicha etiqueta formadora de imágenes se selecciona de ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{97}Ru , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{188}Re .
- 35
12. El conjugado de la reivindicación 11 en donde dicha etiqueta formadora de imágenes es ^{99m}Tc .
13. El conjugado de la reivindicación 9 en donde dicho agente terapéutico es un agente anticoagulación o una citoquina.
14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7 en donde el protocolo de formación de imágenes es una exploración de medicina nuclear tomográfica asistida por computador o plana.
- 40
15. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 en donde dicho anticuerpo se marca con una molécula reportera para uso in vivo para detectar un coágulo de sangre en un paciente humano en donde en la introducción de dicho anticuerpo en dicho paciente dicho anticuerpo marcado se le permite diseminarse a través del sistema circulatorio y en donde el paciente se somete a un protocolo de formación de imágenes para visualizar el coágulo.

16. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 15 en donde dicho protocolo de formación de imágenes es MRI, exploración CT, ultrasonido o exploración de medicina nuclear tomográfica asistida por computador que incluye cintigrafía de cámara gama o PET.
- 5 17. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 15 en donde dicha molécula reportera es una etiqueta nuclear.
18. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 17 en donde dicha etiqueta nuclear es ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{97}Ru , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I o ^{188}Re .
19. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 18 en donde dicha etiqueta nuclear es ^{99m}Tc .
- 10 20. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 para uso in vivo para facilitar la disolución, prevención de crecimiento o remoción de un coágulo de sangre en un humano en donde dicho anticuerpo comprende adicionalmente una disolución del coágulo o agente de prevención de crecimiento de coágulos fusionados, unidos o de otra forma asociados a esto.
- 15 21. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 15 o 17 a 19 en donde el protocolo de formación de imágenes es una exploración de medicina nuclear tomográfica asistida por computador o plana.

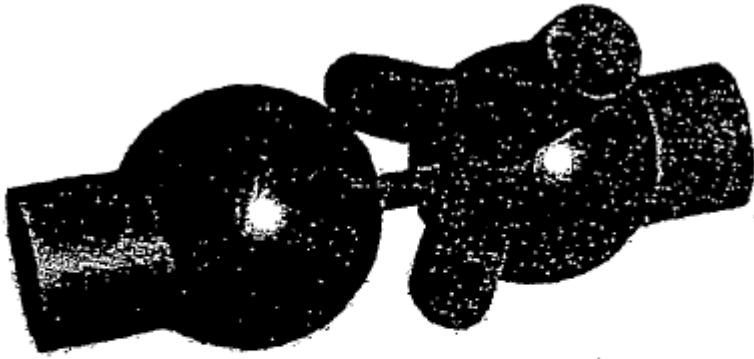
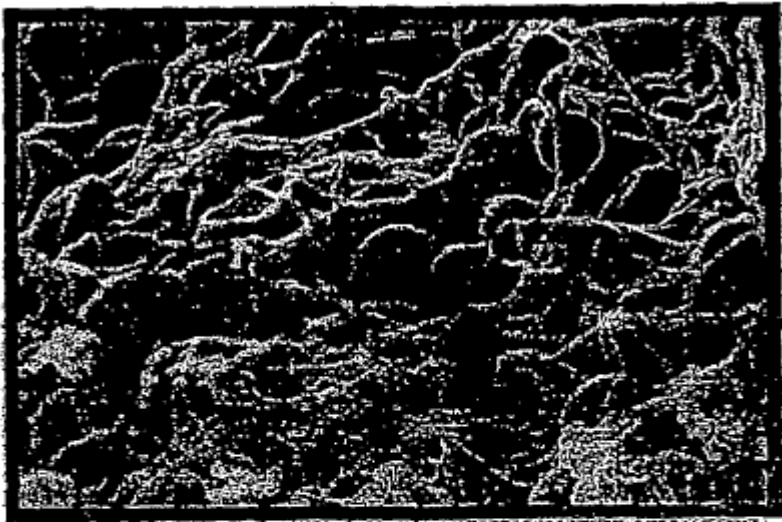


Figura 1A



magnificación X4,200

Figura 1B

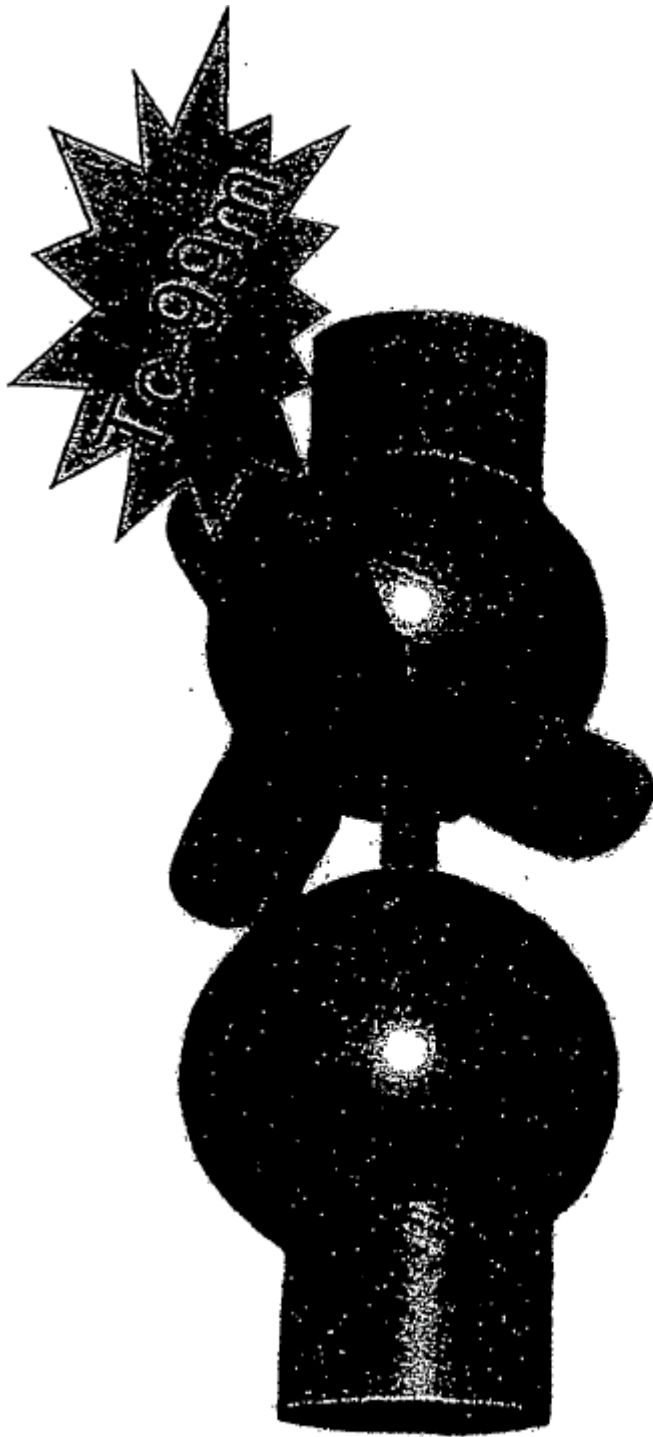


Figura 2

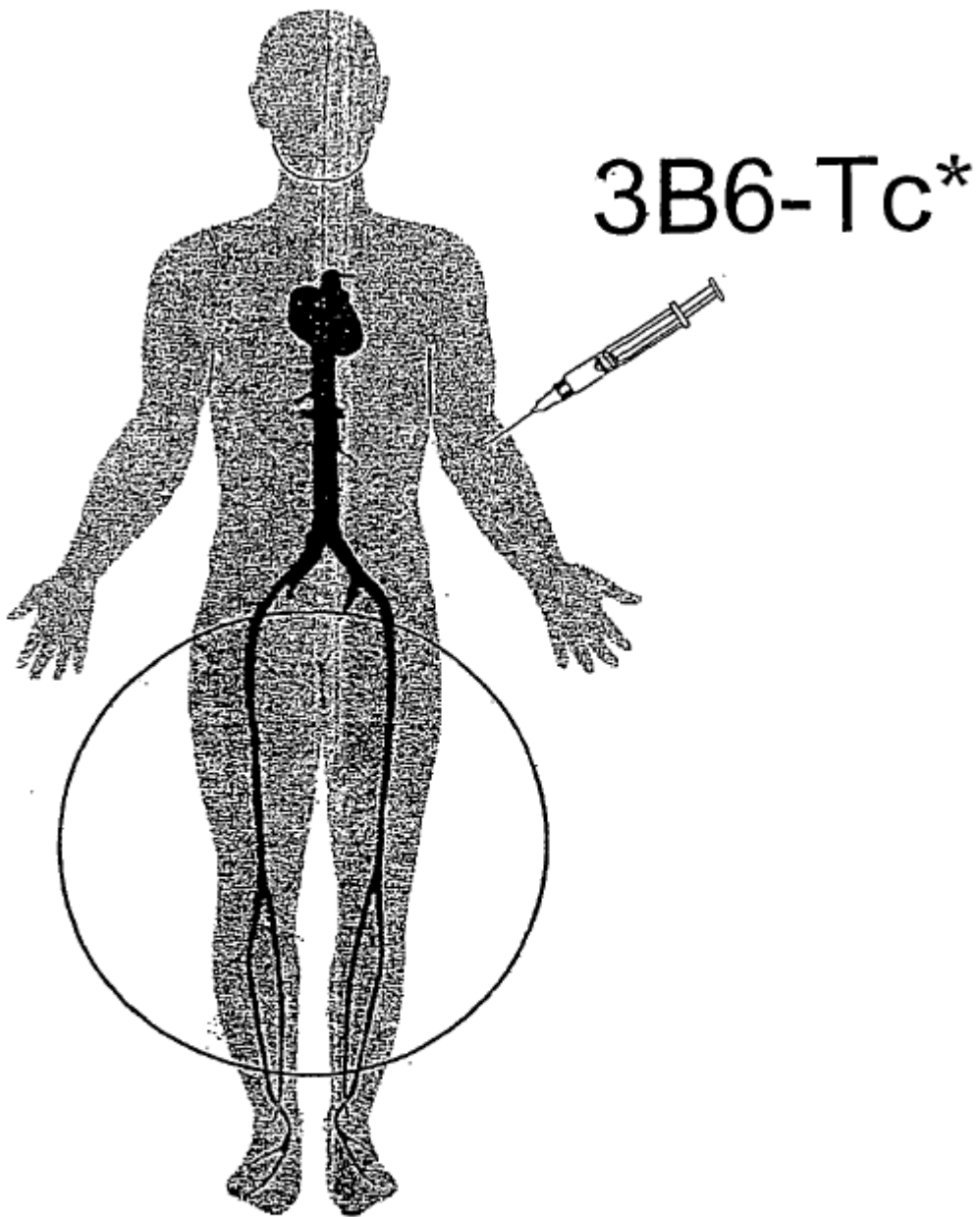


Figura 3A

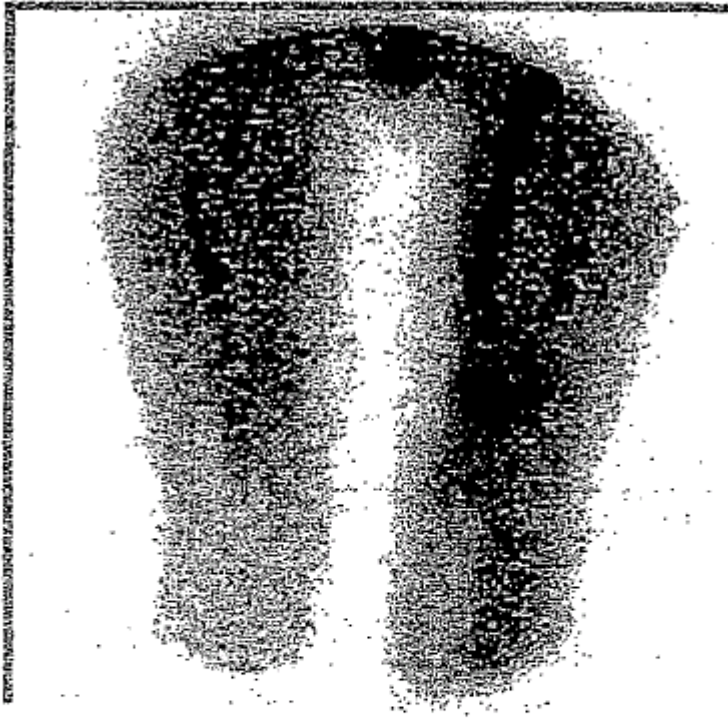


Figura 3B

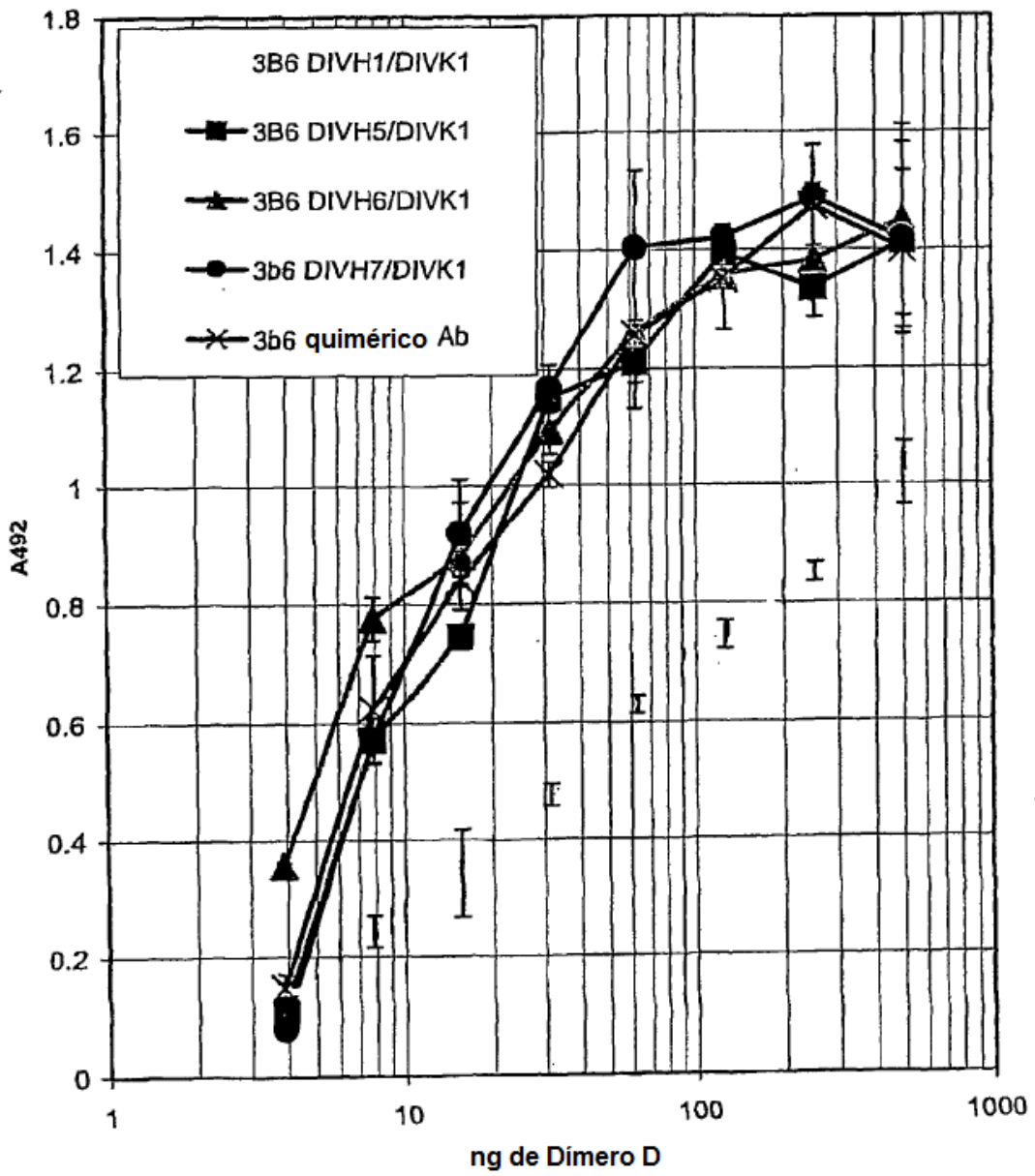


Figura 4A

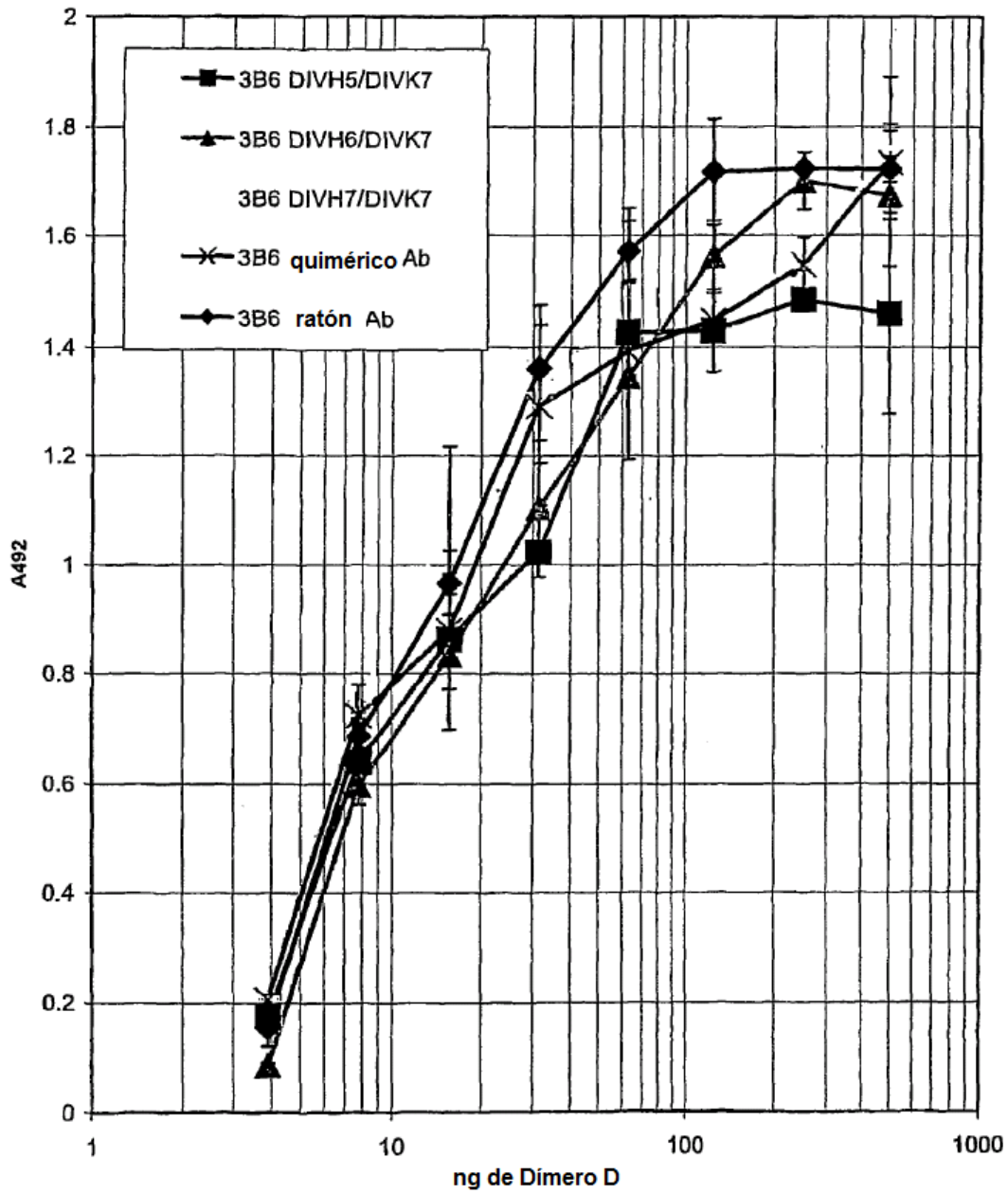


Figura 4B.

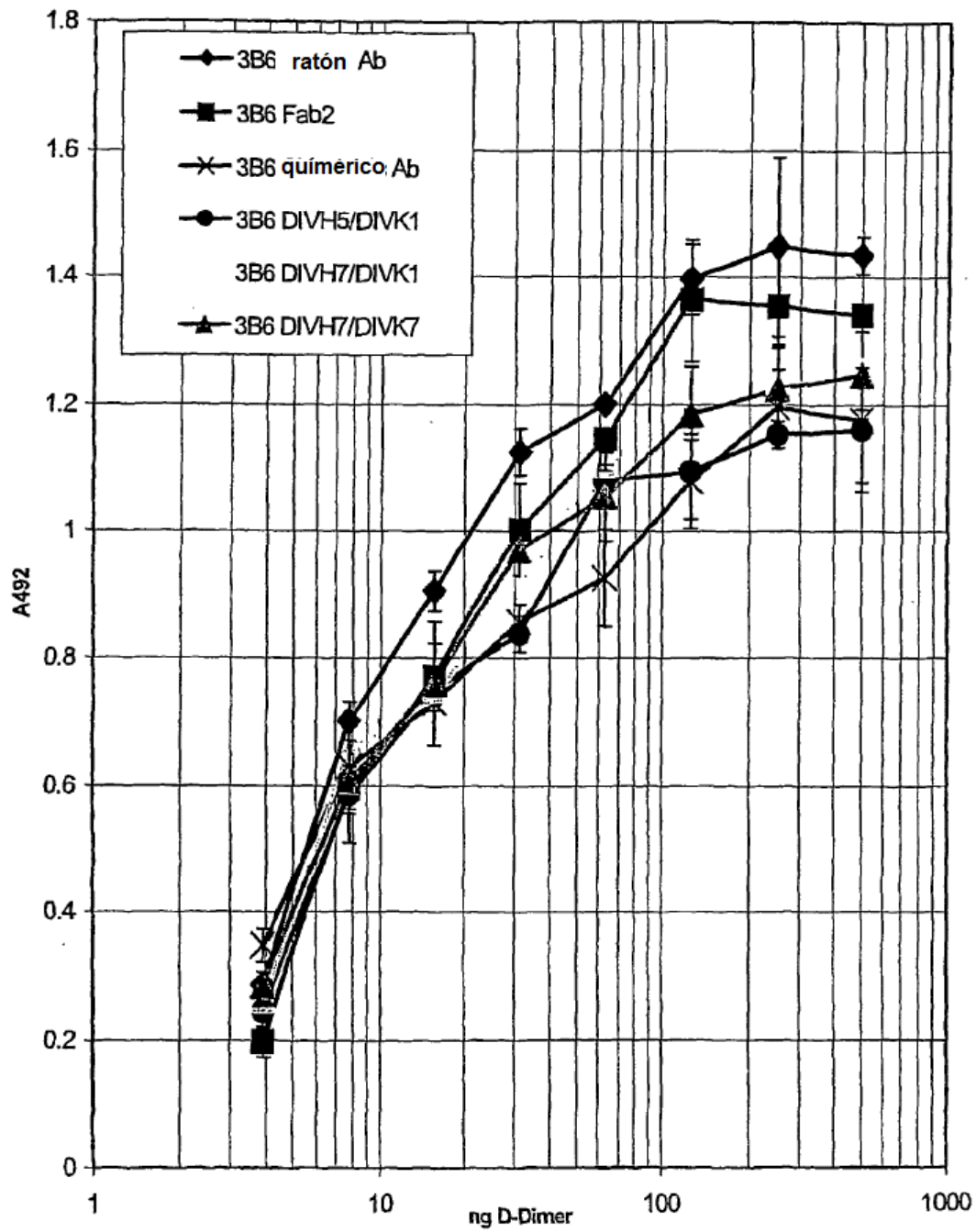


Figura 4C