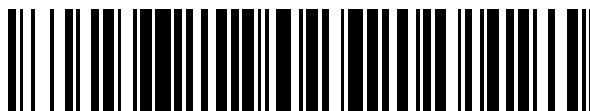


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 452**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **98910277 .7**
96 Fecha de presentación: **10.03.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **0975672**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

54 Título: **Anticuerpos para inhibir la coagulación de la sangre y métodos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:
10.03.1997 US 814806

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
WONG, Hing, C.;
JIAO, Jin-An;
NIEVES, Esperanza, Liliana y
LUEPSCHEN, Lawrence

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 380 452 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 para inhibir la coagulación de la sangre y métodos de utilización de los mismos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos y métodos de utilización de los anticuerpos para inhibir la coagulación de la sangre. En particular, la presente invención se refiere a nuevos anticuerpos que se unen específicamente al factor tisular humano nativo con elevada afinidad. Los anticuerpos de la invención son útiles para una serie de aplicaciones, particularmente para reducir la coagulación de la sangre in vivo.

15 2. Antecedentes

[0002] La coagulación de la sangre ayuda a la homeostasis minimizando la pérdida de sangre. En general, la coagulación de la sangre requiere un daño en los vasos, la agregación plaquetaria, factores de coagulación y la inhibición de fibrinólisis. Los factores de coagulación actúan a través de una cascada que relaciona el daño en los vasos con la formación de un coágulo de sangre (véase en general L. Stryer, *Biochemistry*, 3rd Ed, W.H. Freeman Co., New York; and A.G. Gilman et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Edition, McGraw Hill Inc., New York, pág. 1311-1331).

20 [0003] Existe un acuerdo general de que la activación del factor X en el factor Xa (FXa) es una etapa crítica en el proceso de coagulación de la sangre. En general, FX se convierte en FXa mediante la unión de un complejo catalíticamente activo que incluye "factor tisular" (TF). TF es una proteína de membrana celular expresada de forma controlada que se une al factor VII/VIIa para producir el complejo catalíticamente activo (TF:VIIa). El coágulo de sangre sigue a la activación mediada por FXa de la protrombina. La coagulación de la sangre se puede minimizar mediante la inactivación de TF en las formas no nativas que no puede producir de manera óptima el complejo TF:VIIa. La formación excesiva de FXa se cree que contribuye a varias trombosis, incluyendo reestenosis.

30 [0004] La trombosis puede estar asociada con procedimientos médicos invasivos, tales como cirugía cardíaca (por ejemplo, angioplastia), cirugía abdominotorácica, cirugía arterial, despliegue de dispositivos (por ejemplo, un stent o catéter), o endarterectomía. Además, la trombosis puede estar acompañada de varios trastornos tromboembólicos y coagulopatías, tales como embolia pulmonar (por ejemplo, fibrilación atrial con embolización) y coagulación intravascular diseminada, respectivamente. La manipulación de fluidos corporales también puede dar lugar a trombos no deseados, particularmente en transfusiones de sangre o muestreo de fluidos, así como procedimientos que implican la circulación extracorpórea (por ejemplo, cirugía cardiopulmonar con bypass) y diálisis.

40 [0005] Los anticoagulantes se utilizan a menudo para aliviar o evitar coágulos de sangre asociados con trombosis. La coagulación de sangre se puede minimizar o eliminar a menudo mediante la administración de un anticoagulante adecuado o una mezcla de los mismos, incluyendo uno o más de un derivado de cumarina (por ejemplo, warfarina y dicumarol) o un polímero cargado (por ejemplo, heparina, hirudina o Bivalirrudina). Véase, por ejemplo, Gilman et al., *supra*, R.J. Beigering et al., *Ann. Hemathol.*, 72:177 (1996); J.D. Willerson, *Circulation*, 94:866 (1996).

45 [0006] Sin embargo, la utilización de anticoagulantes están asociada a menudo con efectos secundarios, tales como hemorragia, reoclusión, síndrome de "coágulo blanco", irritación, defectos en el parto, trombocitopenia y disfunción hepática. La administración a largo plazo de anticoagulantes puede incrementar particularmente el riesgo de enfermedades mortales (véase, por ejemplo, Gilman et al., *supra*).

50 [0007] Ciertos anticuerpos con actividad antiplaquetaria también se han utilizado para aliviar varias trombosis. Por ejemplo, Abciximab es un anticuerpo terapéutico que se administra habitualmente para aliviar varios trastornos tromboembólicos, tales como aquellos que aparecen de la angioplastia, infarto de miocardio, angina inestable y estenosis de arteria coronaria. Adicionalmente, se puede utilizar Abciximab como agente profiláctico para reducir el riesgo de infarto de miocardio y angina (J.T. Willerson, *Circulation*, 94:866 (1996); M.L. Simmons et al., *Circulation*, 89:596 (1994)).

55 [0008] También se conocen ciertos anticuerpos anticoagulantes. Particularmente, se ha descrito que ciertos anticuerpos de unión a TF inhiben la coagulación de la sangre, presumiblemente interfiriendo con el ensamblaje de un complejo TF:VIIa catalíticamente activo (véase por ejemplo, Jeske et al., *SEM in THROM. and HEMO.*, 22:213 (1996); Ragni et al., *Circulation*, 93:1913 (1996); Patente Europea No. 0 420 937 B1; W. Rufet al., *Throm. Haemosp.*, 66:529 (1991); M.M. Fiorie et al., *Blood*, 8:3127 (1992)).

60 [0009] Sin embargo, los actuales anticuerpos de unión a TF muestran desventajas significativas que pueden minimizar su idoneidad como anticoagulantes. Por ejemplo, los actuales anticuerpos de unión a TF no muestran una suficiente afinidad de unión para la actividad anticoagulante óptima. Por consiguiente, para muchas patologías trombóticas, para compensar dichas afinidades de unión inefectivas, se deben administrar niveles de anticuerpo inaceptablemente elevadas para minimizar la coagulación de la sangre. Además, los actuales anticuerpos de unión a TF no discriminan de manera eficaz entre TF nativo y

formas no nativas de TF, es decir, los anticuerpos actuales no muestran una especificidad de unión suficiente. Además, los actuales anticuerpos de unión a TF no evitan que FX se una a TF y/o el complejo TF:VIIa.

5 [0010] De este modo, sería deseable tener un anticuerpo anticoagulante que se una a TF humano nativo con una afinidad y selectividad elevadas para inhibir así la coagulación indeseada de sangre y la formación de coágulos de sangre. Sería también deseable tener dicho anticuerpo anticoagulante que evite la unión del Factor X al complejo TF:VIIa.

10 [0011] Fiore M. M. et al, Blood, vol. 80, no. 12 (15 de diciembre), 1992; páginas 3127-3134 describe dos anticuerpos monoclonales anti-TF (TF8-11D12 y TF9-9C3). WO 94/05328 se refiere a moléculas que se unen al factor tisular y alteran el complejo TF:VIIa. WO 96/40921 proporciona anticuerpos injertados en CDR contra factor tisular humano que mantiene la afinidad de unión elevada de anticuerpos monoclonales de roedor contra factor tisular, pero tienen una inmunogenicidad reducida. WO 89/12463 se refiere a un método y composición terapéutica para el tratamiento del infarto de miocardio que comprende la administración de un antagonista de proteína de factor tisular y un agente trombolítico. US 5 437 864 proporciona un método de inhibición de la coagulación en circulación extracorpórea en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal que inhibe la capacidad del factor tisular de unirse al factor VII/VIIa.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

20 [0012] Se han descubierto anticuerpos que proporcionan una actividad anticoagulante superior mediante la unión de un TF humano nativo con una afinidad y especificidad elevadas. De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona la reivindicación 1. Los anticuerpos de la invención pueden inhibir de manera eficaz la coagulación de la sangre in vivo. Los anticuerpos de la invención se pueden unir a TF humano nativo, ya sea solo o presente en un complejo TF:VIIa, evitando de manera efectiva la unión del factor X a TF o ese complejo, y reduciendo así la coagulación de la sangre.

25 [0013] Los anticuerpos preferidos de la invención con monoclonales y unen específicamente y unen un epítipo conformacional predominante a TF humano nativo, cuyo epítipo proporciona un sitio de unión a anticuerpo inesperadamente fuerte. De hecho, los anticuerpos preferidos de la invención se unen a TF humano nativo por lo menos aproximadamente 5 veces más, más habitualmente por lo menos aproximadamente diez veces más que la afinidad de unión mostrada por anticuerpos anticoagulantes anteriores. Adicionalmente, los anticuerpos preferidos de la invención son selectivos para TF humano nativo y no se unen sustancialmente a TF no nativo o desnaturalizado. H36.D2.B7 (secretado por el hibridoma ATCC HB-12255) es un anticuerpo especialmente preferido de la invención.

30 [0014] Los anticuerpos preferidos de la invención se unen a TF, de manera que FX no se une de manera efectiva al complejo TF/factor VIIa, por lo cual FX no se convierte de manera efectiva en su forma activada (FXa). Los anticuerpos preferidos de la invención pueden inhibir la función de TF mediante el bloqueo eficaz de la unión o acceso de FX a moléculas de TF. Véanse, por ejemplo, los resultados del ejemplo 3 a continuación.

35 [0015] Los anticuerpos preferidos de la invención tampoco inhiben significativamente la interacción o unión entre TF y el factor VIIa, o inhiben la actividad del complejo de TF:factor VIIa con respecto a materiales diferentes de FX. Véase, por ejemplo, los resultados del ejemplo 4 siguiente.

40 [0016] La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos (SEC ID:NOS 1-4) de regiones variables de H36.D2.B7 se establecen en las figuras 1A y 1B de los dibujos.

45 [0017] En aspectos preferidos, los anticuerpos de la invención son para utilizar en la inhibición de la coagulación de la sangre y la formación de coágulos de sangre y en la reducción de los niveles de TF humanos.

50 [0018] En general, los anticuerpos de la invención serán útiles para modular prácticamente cualquier respuesta biológica mediada por la unión de FX a TF o el complejo TF:VIIa, incluyendo la coagulación de la sangre indicada anteriormente, la inflamación u otros trastornos.

55 [0019] Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles para aliviar varias trombosis, particularmente para evitar o inhibir la reestenosis, u otras trombosis después de un procedimiento médico invasivo, tal como cirugía arterial o cardíaca (por ejemplo, angioplastia). Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para reducir o incluso eliminar de manera efectiva la coagulación de la sangre que surge de la utilización de dispositivos médicos (por ejemplo, un catéter, stent u otros dispositivos médicos). Los anticuerpos preferidos de la invención serán compatibles con muchas composiciones anticoagulantes, antiplaquetarias y trombolíticas, permitiendo así la administración en un formato de cóctel para reforzar o prolongar la inhibición de la coagulación de la sangre.

60 [0020] Los anticuerpos de la invención también se pueden emplear como anticoagulante en circulación extracorpórea de un mamífero, particularmente un sujeto humano. En dichos métodos, se administran uno o más anticuerpos al mamífero en una cantidad suficiente para inhibir la coagulación de la sangre antes o durante la circulación extracorpórea, tal como puede ocurrir con la cirugía cardiopulmonar con bypass, la cirugía del transplante de órganos u otras cirugías prolongadas.

[0021] Los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar como portadores para fármacos, particularmente productos farmacéuticos dirigidos a la interacción con un coágulo de sangre, tales como estreptoquinasa, activador de plasminógeno de tejido (t-PA) o uroquinasa. De manera similar, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar como agente citotóxico mediante la conjugación de una toxina adecuada al anticuerpo. Los conjugados de los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para reducir los niveles de factor tisular en un mamífero, particularmente un humano, mediante la administración al mamífero de una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención que está unido covalentemente a una toxina celular o una molécula efectora para proporcionar la capacidad de fijación al complemento y la citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo, mediante lo cual el conjugado de anticuerpo se pone en contacto con células que expresan el factor tisular para reducir así los niveles de factor tisular en el mamífero.

[0022] Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en métodos de diagnóstico in vivo que incluyen la obtención de imágenes de diagnóstico in vivo de TF humano nativo.

[0023] Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en ensayos in vitro para detectar TF nativo en una muestra biológica que incluye un fluido biológico (por ejemplo, plasma o suero) o tejido (por ejemplo, una muestra de biopsia). Más particularmente, se pueden utilizar varios inmunoensayos heterogéneos y homogéneos en un formato competitivo o no competitivo para detectar la presencia y preferiblemente una cantidad de TF nativo en la muestra biológica.

[0024] Dichos ensayos de la invención son muy útiles para determinar la presencia o probabilidad de un paciente de tener una coagulación de sangre o un coágulo de sangre. Es decir, la coagulación de la sangre está normalmente acompañada por la expresión de TF en superficies celulares, tales como células que recubren la vasculatura. En ausencia de coagulación de sangre, TF no se expresa normalmente. De este modo, la detección de TF en una muestra de fluido corporal mediante un ensayo de la invención será indicativa de la coagulación de la sangre.

[0025] Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para preparar TF nativo sustancialmente puro, particularmente TF humano nativo, de una muestra biológica. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para detectar y purificar células que expresan TF nativo.

[0026] Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar como componente de un kit de diagnóstico, por ejemplo, para detectar y preferiblemente cuantificar el TF nativo en una muestra biológica. Otros aspectos de la invención se describen más abajo y también se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027] Las figuras 1A y 1B muestran las secuencias de ácido nucleico (SEC ID NOS:1 y 3) y aminoácido (SEC ID NOS:2 y 4) de regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de H36.D2.B7 con regiones hipervariables (CDRs o Regiones Determinantes de Complementariedad) subrayadas (subrayado simple para secuencias de ácido nucleico y subrayado doble para secuencias de aminoácidos).

La figura 2 muestra las constantes de asociación (K_a) y disociación (K_d) de anticuerpos anti-factor tisular tal como se determina mediante ELISA o análisis BIAcore.

La figura 3 muestra la inhibición de la activación de FX mediada por el complejo TF:VIIa mediante la preincubación con factores anti-factor tisular.

La figura 4 muestra la inhibición de actividad de TF:VIIa hacia el sustrato S-2288 específico de FIBA por los anticuerpos anti-factor tisular.

La figura 5 muestra la capacidad del anticuerpo H36 de incrementar el tiempo de protrombina (PT) en un ensayo de coagulación iniciado por TF.

Las figuras 6A y 6B muestran gráficamente la relación entre la formación de FXa y la proporción molar del anticuerpo H36.D2 y rhTF. Figura 6A: H36.D2 se preincubó con el complejo TF:VIIa antes de añadir FX. Figura 6B: H36.D2, TF:VIIa y FX se añadieron simultáneamente.

La figura 7 muestra la inhibición de la actividad de TF:VIIa por el anticuerpo H36.D2 en un ensayo de activación de células J-82. Las figuras 8A y 8B son representaciones de transferencias de puntos que muestran que el anticuerpo H36.D2 se une a un epítipo conformacional en rhTF. Carril 1- rhTF nativo, Carril 2- rhTF nativo tratado con urea 8M, Carril 3- rhTF nativo tratado con urea 8 M y DTT 5 mM. En la figura 8A, la transferencia se expuso durante aproximadamente 40 segundos, mientras que en la figura 8B, la transferencia se expuso durante 120 segundos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0028] Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos preferidos de la invención muestran una afinidad sustancial para TF humano nativo. En particular, los anticuerpos preferidos de la invención muestran una constante de asociación (K_a , M^{-1}) para

TF humano nativo de por lo menos aproximadamente 1×10^8 según se determina mediante análisis de plasmones de superficie (particularmente, análisis BIAcore según los procedimientos del ejemplo 1 siguiente), más preferiblemente por lo menos aproximadamente 5×10^8 según se determina mediante análisis de plasmones de superficie, aún más preferiblemente una K_a (K_a , M^{-1}) para TF humano nativo de por lo menos aproximadamente 1×10^{10} según se determina mediante análisis de plasmones de superficie. Dicha afinidad de unión sustancial de anticuerpos de la invención contrasta claramente con las afinidades mucho menores de anticuerpos descritos previamente.

[0029] En este aspecto, se puede utilizar una concentración efectiva bastante baja de un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, una concentración relativamente baja de anticuerpo para inhibir la función de TF según se desee (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 95, 98 ó 99 por ciento de inhibición) en un ensayo in vitro, tal como el descrito en el ejemplo 3 siguiente.

[0030] Los anticuerpos preferidos son altamente específicos para TF humano nativo, y preferiblemente no se unen sustancialmente con TF no nativo. Los anticuerpos preferidos no se unen sustancialmente a TF no nativo u otras moléculas inmunológicamente no relacionadas según se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de transferencia de puntos estándar (por ejemplo, sin unión o esencialmente sin unión a TF no nativo detectado visualmente mediante ensayo de transferencia de puntos). Las referencias de la presente invención a "TF no nativo" significan un TF humano natural o recombinante que ha sido tratado con un agente caotrópico, de manera que se desnaturaliza el TF. Los agentes caotrópicos incluyen un detergente (por ejemplo, SDS), urea, combinada con ditiotretol o β -mercaptoetanol; clorhidrato de guanidina y similares. El anticuerpo H36, H36.D2 o H36.D2.B7 no se une sustancialmente a dicho TF no nativo. Véase, por ejemplo, los resultados del ejemplo 8 siguiente y es un ensayo de transferencia de puntos.

[0031] Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos preferidos de la invención también se unirán con TF, de manera que FX no se une de manera efectiva al complejo TF/factor VIIa, mediante lo cual FX no se convierte de manera efectiva en un forma activada (FXa). Los anticuerpos particularmente preferidos de la invención inhibirán fuertemente la actividad de FX a un complejo TF/factor VIIa, por ejemplo, una inhibición de por lo menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente el 80%, e incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% ó 95%, incluso a concentraciones bajas de TF, tales como menos de aproximadamente 1,0 nM de TF, o incluso menos de aproximadamente 0,20 nM ó 0,10 nM de TF, según se determina mediante un ensayo de unión in vitro estándar tal como el del ejemplo 3 siguiente e incluye poner en contacto FX con un complejo de TF:factor VIIa tanto en presencia (es decir, muestra experimental) como en ausencia (es decir, muestra de control) de un anticuerpo de la invención y determinar la diferencia en porcentaje de la conversión de FX a FXa entre las muestras experimentales y de control.

[0032] Los anticuerpos de la invención son preferiblemente sustancialmente puros cuando se utilizan en los métodos y ensayos descritos. Las referencias a un anticuerpo que es "sustancialmente puro" significa un anticuerpo o proteína que se ha separado de componentes que lo acompañan de forma natural. Por ejemplo, mediante la utilización de técnicas de purificación por inmunofinidad estándar o de afinidad con proteína A, un anticuerpo de la invención se puede purificar a partir de un cultivo de hibridoma mediante la utilización de TF nativo como un antígeno o resina de proteína A. De manera similar, se puede obtener TF nativo en una forma sustancialmente pura mediante la utilización de un anticuerpo de la invención con técnicas de purificación de inmunofinidad estándar. Particularmente, un anticuerpo o proteína es sustancialmente puro cuando por lo menos un 50% de la proteína total (% en peso de la proteína total en una muestra determinada) es un anticuerpo o proteína de la invención. Preferiblemente, el anticuerpo o proteína es por lo menos un 60% en peso de la proteína total, más preferiblemente por lo menos un 75% en peso, incluso más preferiblemente por lo menos un 90% en peso, y lo más preferiblemente por lo menos un 98% en peso del material total. La pureza se puede analizar fácilmente mediante métodos conocidos, tales como electroforesis en gel SDS (PAGE), cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía de afinidad) en análisis HPLC.

[0033] Las secuencias de ácidos nucleicos (SEC ID NOS: 1 y 3) y aminoácidos (SEC ID NOS: 2 y 4) de un anticuerpo preferido de la invención (H36.D2.B7) se muestran en las figuras 1A y 1B de los dibujos. Las SEC ID NOS. 1 y 2 son las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos respectivamente de la región variable de cadena ligera, y SEC ID NOS. 3 y 4 son las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos respectivamente de la región variable de cadena pesada, con las regiones hipervariables (CDR o Regiones Determinantes de Complementariedad) subrayada en todas estas secuencias.

[0034] Los anticuerpos preferidos adicionales de la invención tendrán una identidad de secuencia sustancial con una o ambas de las secuencias de cadena ligera o pesada mostradas en las figuras 1A y 1B. Más particularmente, los anticuerpos preferidos incluyen aquellos que tienen por lo menos aproximadamente un 70 por ciento de homología (identidad en la secuencia) con la SEC ID NOS. 2 y/o 4, más preferiblemente aproximadamente un 80 por ciento o más de homología con las SEC ID NOS. 2 y/o 4, aún más preferiblemente aproximadamente un 85, 90 ó 95 por ciento o más de homología con las SEC ID NOS. 2 y/o 4.

[0035] Los anticuerpos preferidos de la invención tendrán una identidad en la secuencia elevada con las regiones hipervariables (mostradas con un doble subrayado en las figuras 1A y 1B) de las SEC ID NOS. 2 y 4). Los anticuerpos especialmente preferidos de la invención tendrán tres regiones hipervariables de la región variable de cadena ligera de H36.D2.B7 (aquellas regiones hipervariables mostradas con el subrayado en la figura 1A y son las siguientes: 1) LASQTID (SEC ID NO:5); 2) AATNLAD (SEC ID NO:6); y 3) QQVYSSPFT (SEC ID NO:7)).

[0036] Los anticuerpos especialmente preferidos de la invención también tendrán tres regiones hipervariables de la región variable de cadena pesada de H36.D2.B7 (aquellas regiones hipervariables mostradas con subrayado en la figura 1B y son las siguientes: 1) TDYNNVY (SEC ID NO:8); 2) YIDPYNGITIYDQNFKG (SEC ID NO:9); y 3) DVTTALDF (SEC ID NO: 10).

5 **[0037]** Los ácidos nucleicos de la memoria tienen preferiblemente una longitud suficiente (preferiblemente por lo menos aproximadamente 100, 200 ó 250 pares de bases) para unirse a la secuencia de SEC ID NO:1 y/o SEC ID NO:3 bajo las siguientes condiciones moderadamente rigurosas (referidas aquí como condiciones de "rigurosidad normal"): utilización de un tampón de hibridación que comprende formamida al 20% en tampón de solución salina 0,8 M/citrato de sodio 0,08M (SSC) a una temperatura de 37°C y que permanece unido cuando se somete a lavado una vez con ese tampón SSC a 37°C.

10 **[0038]** Más preferiblemente, los ácidos nucleicos de la memoria (preferiblemente por lo menos aproximadamente 100, 200 ó 250 pares de bases) se unirán a la secuencia de SEC ID NO:1 y/o SEC ID NO:3 bajo las siguientes condiciones rigurosas elevadas (referidas aquí como condiciones de "rigurosidad elevada"): utilización de un tampón de hibridación que comprende formamida al 20% en tampón de solución salina 0,9 M/citrato de sodio 0,09M (SSC) a una temperatura de 42°C y que permanece unido cuando se somete a lavado dos veces con ese tampón SSC a 42°C.

15 **[0039]** Los ácidos nucleicos de la memoria comprenden preferiblemente por lo menos 20 pares de bases, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 50 pares de bases, y aún más preferiblemente un ácido nucleico de la invención comprende por lo menos aproximadamente 100, 200, 250 ó 300 pares de bases.

20 **[0040]** Los ácidos nucleicos generalmente preferidos de la invención expresarán un anticuerpo de la invención que muestra las afinidades de unión preferidas y otras propiedades aquí descritas.

25 **[0041]** Los ácidos nucleicos preferidos de la invención también tendrán una identidad en la secuencia sustancial con una o ambas de las secuencias de cadena ligera o pesada mostradas en las figuras 1A y 1B. Más particularmente, los ácidos nucleicos preferidos comprenderán una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente un 70 por ciento de homología (identidad en la secuencia) con la SEC ID NOS. 1 y/o 3, más preferiblemente aproximadamente un 80 por ciento o más de homología con las SEC ID NOS. 1 y/o 3, aún más preferiblemente aproximadamente un 85, 90 ó 95 por ciento o más de homología con las SEC ID NOS. 1 y/o 3.

30 **[0042]** Las secuencias de ácidos nucleicos particularmente preferidas de la invención tendrán una identidad en la secuencia elevada con las regiones hipervariables (mostradas con subrayado en las figuras 1A y 1B) de las SEC ID NOS. 1 y 3). Los ácidos nucleicos especialmente preferidos incluyen aquellos que codifican una región variable de cadena ligera de anticuerpo y que tienen tres secuencias que codifican regiones hipervariables de H36.D2.B7 (aquellas regiones hipervariables mostradas con el subrayado en la figura 1A y son las siguientes: 1) CTGGCAAGTCAGACCATTGAT (SEC ID NO:11); 2) GCTGCCACCAACTTGGCAGAT (SEC ID NO: 12); y 3) CAACAAGTTTACAGTTCTCCATTCACGT (SEC ID NO:13)).

35 **[0043]** Los ácidos nucleicos especialmente preferidos también codifican una región variable de cadena pesada de anticuerpo y tienen tres secuencias que codifican regiones hipervariables de H36.D2.B7 (aquellas regiones hipervariables mostradas con subrayado en la figura 1B y son las siguientes: 1) ACTGACTACAACGTGTAC (SEC ID NO:14); 2) TATATTGATCCTTACAATGGTATTACTATCTACGACCA GAACTTCAAGGGC (SEC ID NO:15); y 3) GATGTGACTACGGCCCTTGAC TTC (SEC ID NO: 16)).

40 **[0044]** Los ácidos nucleicos de la invención están aislados, lo que significa que un ácido nucleico determinado constituye normalmente por lo menos aproximadamente un 0,5%, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 2%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 5% en peso del ácido nucleico total presente en una fracción determinada. Un ácido nucleico parcialmente puro constituye por lo menos aproximadamente un 10%, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 30%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 60% en peso de ácido nucleico total presente en una fracción determinada. Un ácido nucleico puro constituye por lo menos aproximadamente un 80%, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% en peso del ácido nucleico total presente en una fracción determinada.

50 **[0045]** Los anticuerpos de la invención se pueden preparar mediante técnicas generalmente conocidas en la técnica, y se generan habitualmente para una muestra purificada de TF nativo, habitualmente TF humano nativo, preferiblemente factor tisular humano recombinante (rhTF). El factor tisular humano recombinante truncado o "rhTF" (compuesto de 243 aminoácidos y que carece del dominio citoplasmático) es particularmente preferido para generar anticuerpos de la invención. Los anticuerpos también se pueden generar a partir de un péptido inmunogénico que comprende uno o más epítopos de TF nativo que no son mostrados por un TF no nativo. Las referencias aquí a "TF nativo" incluyen dichas muestras de TF, incluyendo dicho rhTF. Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos monoclonales son generalmente preferidos, aunque también se pueden utilizar anticuerpos policlonales.

60 **[0046]** Más particularmente, los anticuerpos se pueden preparar inmunizando un mamífero con una muestra purificada de TF humano nativo, o un péptido inmunogénico descrito anteriormente, solo o complejo con un portador. Entre los mamíferos adecuados se incluyen animales típicos de laboratorio, tales como oveja, cabras, conejos, cobayas, ratas y ratones. Las ratas y los ratones, especialmente los ratones, son preferidos para obtener anticuerpos monoclonales. El antígeno se puede administrar al mamífero mediante un conjunto de rutas adecuadas, tales como inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o intracutánea. El intervalo óptimo de inmunización, la dosis de inmunización, etc., pueden variar en intervalos relativamente amplios y se pueden determinar empíricamente en base a esta memoria. Los procedimientos habituales implican la inyección del antígeno varias veces durante unos meses. Los anticuerpos se recogen del suero del animal inmunizado mediante técnicas

estándar y se criban para encontrar anticuerpos específicos para TF humano nativo. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir en células que producen anticuerpos y estas células se utilizan para generar anticuerpos monoclonales mediante técnicas de fusión estándar para formar células de hibridoma. Véase G. Kohler, et al., *Nature*, 256:456 (1975). Habitualmente, esto implica la fusión de una célula productora de anticuerpos con una línea celular inmortal, tal como una célula de mieloma, para producir la célula híbrida. Alternativamente, se pueden producir anticuerpos monoclonales a partir de células mediante el método de Huse, et al., *Science*, 256:1275 (1989).

[0047] Un protocolo adecuado proporciona la inmunización intraperitoneal de un ratón con una composición que comprende complejo rhTF purificado realizado durante un periodo de aproximadamente dos a siete meses. A continuación, las células del bazo se pueden extraer del ratón inmunizado. El suero del ratón inmunizado se analiza por los títulos de anticuerpos específicos para rhTF antes de la escisión de las células del bazo. Las células del bazo de ratón escindidas se fusionan a continuación a una línea celular linfocítica homogénea o heterogénea (preferiblemente homogénea) adecuada que tiene un marcador, tal como deficiencia de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) o deficiencia de timidina quinasa (TK-). Preferiblemente, se utiliza una célula de mieloma como línea celular linfocítica. Las células de mieloma y las células de bazo se mezclan juntas, por ejemplo, a una proporción de aproximadamente 1 a 4 células de mieloma con respecto a células de bazo. Las células se pueden fusionar mediante el método de polietilenglicol (PEG). Véase G. Kohler, et al., *Nature*, supra. El hibridoma clonado de este modo se desarrolla en un medio de cultivo, por ejemplo RPMI-1640. Véase G. E. More, et al., *Journal of American Medical Association*, 199:549 (1967). Los hibridomas, desarrollados después del procedimiento de fusión, se criban mediante, por ejemplo, radioinmunoensayo o inmunoensayo con enzimas para la secreción de anticuerpos que se unen específicamente al rhTF purificado, por ejemplo, se seleccionan anticuerpos que se unen a rhTF purificado, pero no a TF no nativo. Preferiblemente, se utiliza un ELISA para el cribado. Los hibridomas que muestran resultados positivos después de dicho cribado se pueden expandir y clonar mediante el método de dilución limitante. Preferiblemente, se realizan cribados adicionales para seleccionar anticuerpos que se pueden unir a rhTF en solución, así como en una muestra de fluido humano. Los anticuerpos aislados se pueden purificar posteriormente mediante cualquier técnica inmunológica adecuada, incluyendo cromatografía de afinidad. El cultivo de hibridoma que produce el anticuerpo particular preferido H36.D2.B7 se ha depositado según el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC) en 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 10852. El cultivo de hibridoma se depositó con la ATCC el 8 de enero de 1997 y se le asignó el Número de Acceso ATCC HB-12255.

[0048] Para aplicaciones terapéuticas humanas, puede ser deseable producir derivados de anticuerpos quiméricos, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que combinan una región variable animal no humana y una región constante humana, para hacer así que los anticuerpos sean menos inmunogénicos en un sujeto humano que el correspondiente anticuerpo no quimérico. Se puede preparar una variedad de tipos de dichos anticuerpos quiméricos, incluyendo, por ejemplo, produciendo quimeras de regiones variables humanas, en que partes de las regiones variables, especialmente las regiones conservadas del dominio de unión a antígeno, son de origen humano y sólo las regiones hipervariables son de origen no humano. Véanse también las descripciones de anticuerpos quiméricos y métodos de producción de los mismos en S.L. Morrison, *Science*, 229:1202-1207 (1985); Oi et al., *BioTechniques*, 4:214 (1986); Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:7308-7312 (1983); Kozbor et al., *Immunology Today*, 4:7279 (1983); Olsson et al., *Meth. Enzymol.*, 9:3-16 (1982). Adicionalmente, se pueden utilizar ratones transgénicos. Por ejemplo, se han creado ratones transgénicos que portan repertorios de anticuerpos humanos que se pueden inmunizar con TF humano nativo. Los esplenocitos de ratones transgénicos inmunizados se pueden entonces utilizar para crear hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos que reaccionan específicamente con TF humano nativo tal como se ha descrito anteriormente. Véase, N. Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994); L.L. Green et al., *Nature Genet.*, 7:13-21 (1994); S.L. Morrison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6851-6855 (1994).

[0049] Los ácidos nucleicos de anticuerpos de la invención también se pueden preparar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (véanse los cebadores descritos en el ejemplo 1 siguiente). Véase, en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning* (2d ed. 1989). Dichos ácidos nucleicos también se pueden sintetizar mediante métodos conocidos, por ejemplo, el método de transferencia de triéster (véase *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press (M.J. Gait, ed., 1984)), o utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado disponible comercialmente. Dichos ácido nucleico de la invención preparado se puede utilizar para expresar un anticuerpo de la invención mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención se puede incorporar en un vector adecuado por métodos conocidos mediante, por ejemplo, la utilización de enzimas de restricción para hacer cortes en el vector para la inserción de la construcción seguido de la unión. El vector que contiene la secuencia de ácidos nucleicos insertada, unida operativamente de forma adecuada a una secuencia de promotor, se introduce a continuación en células huésped para la expresión. Véase, en general, Sambrook et al., supra. La selección de vectores adecuados se puede realizar empíricamente en base a factores que dependen del protocolo de clonación. Por ejemplo, el vector debe ser compatible con y tener el replicón adecuado para la célula huésped que se utiliza. Además, el vector debe ser capaz de acomodar la secuencia de ácidos nucleicos insertada. Las células huésped adecuadas incluirán una amplia variedad de células eucariotas o procariotas, tales como *E. Coli* y similares.

[0050] El peso molecular de los anticuerpos de la invención variará dependiendo de varios factores, tales como el uso pretendido y si el anticuerpo incluye una toxina conjugada o fusionada recombinantemente, un producto farmacéutico o marcador detectable, o similares. En general, un anticuerpo de la invención tendrá un peso molecular de entre aproximadamente 20 a 150 kDa. Dichos pesos moleculares se pueden determinar fácilmente mediante métodos de tamaño molecular, tales como electroforesis en gel SDS-PAGE seguido de la tinción con proteínas o análisis de transferencia Western.

[0051] "Anticuerpo de la invención" u otro término similar se refiere a la inmunoglobulina completa, así como a fragmentos inmunológicamente activos que se unen a TF nativo. Las inmunoglobulinas y los fragmentos inmunológicamente activos de las

mismas incluyen un sitio de unión a anticuerpo (es decir, un epítipo capaz de unirse específicamente a TF humano nativo). Entre los fragmentos de anticuerpo de ejemplo se incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(v), Fab', F(ab')₂, "medias moléculas" obtenidas mediante la reducción de los enlaces disulfuro de inmunoglobulinas, inmunoglobulinas de cadena sencilla, u otros fragmentos de unión a antígeno adecuados (véase, por ejemplo, Bird et al., Science, pp. 242-424 (1988); Huston et al., PNAS, (USA), 85:5879 (1988); Webber et al., Mol. Immunol., 32:249 (1995)). El anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo pueden ser de animal (por ejemplo, un roedor, tal como un ratón o una rata), o una forma quimérica (véase Morrison et al., PNAS, 81:6851 (1984); Jones et al., Nature, pp. 321, 522 (1986)). Se pueden preferir los anticuerpos de cadena sencilla de la invención.

5
10 **[0052]** De manera similar, un "ácido nucleico de la invención" se refiere a una secuencia que se puede expresar para proporcionar un anticuerpo de la invención tal como se especifica que significa dicho término inmediatamente arriba.

15 **[0053]** Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de la invención se pueden administrar a un mamífero, preferiblemente un primate, tal como un humano, para prevenir o reducir trombosis, tal como reestenosis, habitualmente en una composición que incluye uno o más portadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril o solución salina, aceites de origen vegetal, y similares. En particular, pueden ser copolímeros de polímero láctido, glicólido láctido o copolímeros de polioxietileno, polioxipropileno como excipientes para controlar la liberación de las composiciones que contienen anticuerpos descritas aquí. Otros sistemas de administración potencialmente útiles incluyen partículas de etileno y acetato de vinilo, bombas osmóticas y sistemas de perfusión implantable y liposomas. En general, una composición de anticoagulante de la invención estará en forma de una solución o una suspensión e incluirá preferiblemente aproximadamente de 0,01% a 10% (p/v) del anticuerpo de la presente invención, preferiblemente aproximadamente de 0,01 % a 5% (p/p) del anticuerpo. El anticuerpo se puede administrar como un único principio activo en la composición, o como un cóctel que incluye uno o más de otros anticoagulantes (por ejemplo, heparina, hirudina, o Bivalirudina), antiplaquetarios (por ejemplo, Abciximab o agentes trombolíticos (por ejemplo, activador de plasminógeno de tejido, estreptoquinasa y uroquinasa). Adicionalmente, los anticuerpos de la invención se pueden administrar antes, o después, de la administración de uno o más agentes anticoagulantes, antiplaquetarios o trombolíticos para reforzar o prolongar la actividad anticoagulante deseada.

20
25
30 **[0054]** Tal como se ha descrito también anteriormente, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para reducir la potencial coagulación de sangre que surge del uso de dispositivos médicos, por ejemplo, un dispositivo de acción interna, tal como un catéter, un stent, etc. En un método preferido, el dispositivo se puede tratar con un anticuerpo de la invención (por ejemplo, como una solución salina de 1 mg/ml) antes de entrar en contacto con un fluido corporal. Alternativamente, o adicionalmente, un anticuerpo de la invención se puede combinar con el fluido corporal en una cantidad suficiente para minimizar la coagulación de la sangre.

35 **[0055]** Las composiciones anticoagulantes terapéuticas según la presente invención son adecuadas para la utilización en la administración parenteral o intravenosa, particularmente en forma de soluciones líquidas. Dichas composiciones se pueden administrar convenientemente en dosis unitarias y se pueden preparar según métodos conocidos en el sector farmacéutico. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, (Mack Publishing Co., Easton PA, (1980)). Por el término "dosis unitaria" se entiende una composición terapéutica de la presente invención utilizada en una unidad físicamente discreta adecuada como dosis unitaria para un primate, tal como un humano, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente o portador requerido. La dosis unitaria dependerá de una variedad de factores que incluyen el tipo y la gravedad de la trombosis a tratar, la capacidad del sistema de coagulación de sangre del sujeto a utilizar el anticuerpo, el grado de inhibición o neutralización de la activación de FX deseada. Las cantidades precisas del anticuerpo a administrar típicamente estarán guiadas por el criterio del médico, aunque la dosis unitaria dependerá en general de la ruta de administración y estará en el intervalo de 10 ng/kg de peso corporal hasta 50 mg/kg de peso corporal por día, más habitualmente en el intervalo de 100 ng/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día. Las pautas adecuadas para la administración inicial en administraciones de refuerzo también son variables, pero se tipifican por una administración inicial seguida por dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, se pueden realizar perfusiones intravenosas continuas o intermitentes de forma suficiente para mantener concentraciones de por lo menos desde aproximadamente 10 nanomolar a 10 micromolar del anticuerpo en la sangre.

40
45
50
55 **[0056]** En algunos casos, puede ser deseable modificar el anticuerpo de la presente invención para transmitir una propiedad biológica, química o física deseable al mismo. Más particularmente, puede ser útil conjugar (es decir unir covalentemente) el anticuerpo a un agente farmacéutico, por ejemplo, un fármaco fibrinolítico, tal como t-Pa, estreptoquinasa, o uroquinasa para proporcionar actividad fibrinolítica. Dicha unión se puede realizar mediante diversos métodos, incluyendo la utilización de una molécula de unión, tal como un agente reticulante de proteína heterobifuncional, por ejemplo, SPDP, carbodimida, o similar, o mediante métodos recombinantes.

60 **[0057]** Además de productos farmacéuticos, tales como un agente fibrinolítico, se puede conjugar un anticuerpo de la invención a una toxina de, por ejemplo, origen vegetal o bacteriano, tal como la toxina de la difteria (es decir, DT), toxina shiga, abrina, toxina del cólera, ricina, saporina, exotoxinas de pseudomonas (PE), proteína antiviral de ombú o gelonina. Los fragmentos biológicamente activos de dichas toxinas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, cadena A de DT y cadena A de ricina. La toxina también puede ser un agente activo en las superficies celulares, tales como fosfolipasas (por ejemplo, fosfolipasa C). Como otro ejemplo, la toxina puede ser un fármaco quimioterapéutico, tal como, por ejemplo, vendesina, vincristina, vinblastina, metotrexato, adriamicina, bleomicina, o cisplatino, o, la toxina puede ser un radionucleido, tal como, por ejemplo, yodo-131, itrio-90, renio-188 o bismuto-212 (véase en general, Moskaug et al., J. Biol. Chem., 264:15709 (1989); 1.

Pastan et al., *Cell*, 47:641 (1986); Pastan et al., *Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents*, *Ann. Rev. Biochem.*, 61:331 (1992); *Chimeric Toxins* Olsnes and Phil, *Pharmac. Ther.*, 25:355 (1982); solicitud PCT publicada No. WO 94/29350; solicitud PCT publicada No. WO 94/04689; y patente de Estados Unidos No. 5,620,939). Además, tal como se ha descrito anteriormente, además de una toxina, un anticuerpo de la invención se puede conjugar a una molécula efectora (por ejemplo, IgG1 o IgG3) para proporcionar la capacidad de fijación a complemento y citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo tras la administración a un mamífero.

[0058] Dicho conjugado de anticuerpo/citotoxina o molécula efectora se puede administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz a un mamífero, preferiblemente un primate, tal como un humano, donde se sabe que el mamífero tiene o se sospecha que tiene células tumorales, células del sistema inmune, o células de endotelio capaces de expresar TF. Ejemplos de dichas células tumorales, células del sistema inmune y células de endotelio incluyen tumores malignos de la mama y pulmón, monocitos y endotelio vascular.

[0059] Los anticuerpos de la invención también se pueden conjugar con una variedad de otros agentes farmacéuticos además de los descritos anteriormente, tales como, por ejemplo, enzimas, hormonas, agentes quelantes capaces de unirse a un radionucleido, así como otras proteínas y polipéptidos útiles para el diagnóstico o tratamiento de la enfermedad. Para fines de diagnóstico, el anticuerpo de la presente invención se puede utilizar de forma marcada de forma detectable o no marcada. Por ejemplo, se puede utilizar de forma adecuada una amplia variedad de marcadores para marcar de forma detectable el anticuerpo, tal como radionucleidos, agentes fluorescentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos, tales como, por ejemplo, haptenos y similares.

[0060] También se describen métodos de diagnóstico incluyendo obtención de imágenes de diagnóstico in vivo [véase, por ejemplo, A.K. Abbas, *Cellular and Molecular Immunology*, pág. 328 (W.B. Saunders Co. 1991)]. Para la mayoría de aplicaciones de obtención de imágenes in vivo, un anticuerpo de la invención se puede marcar de forma detectable con, por ejemplo, ¹²⁵I, ³²P, ⁹⁹Tc, u otra etiqueta detectable, y posteriormente administrarse a un mamífero, particularmente un humano, durante una cantidad de tiempo predeterminado suficiente para permitir que el anticuerpo entre en contacto con una diana deseada. A continuación, el sujeto se rastrea mediante procedimientos conocidos, tales como un análisis de cámara escintigráfica para detectar la unión del anticuerpo. El análisis podría ayudar en el diagnóstico y el tratamiento de un conjunto de trombosis, tales como las descritas específicamente aquí. El método es particularmente útil cuando se utiliza conjuntamente con cirugía cardíaca, particularmente angioplastia, u otro procedimiento quirúrgico donde puede tener lugar la formación indeseada de un coágulo de sangre, para visualizar el desarrollo o movimiento de un coágulo de sangre.

[0061] Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para preparar TF nativo sustancialmente puro (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 90% puro, preferiblemente por lo menos aproximadamente 96 ó 97% puro), particularmente TF humano nativo a partir de una muestra biológica. Por ejemplo, el TF nativo se puede obtener tal como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, L.V.M. Rao et al., *Thrombosis Res.*, 56:109 (1989)) y purificarse mezclando la solución con un soporte sólido que comprende el anticuerpo para formar una mezcla de reacción de acoplamiento. Los soportes sólidos de ejemplo incluyen una pared de una placa, tal como una placa de microtitulación, así como soportes que incluyen o que consisten en poliestireno, cloruro de polivinilo, un dextrano reticulado, tal como Sephadex™ (Farmacia Fine Chemicals), agarosa, partículas de poliestireno (Abbott Laboratories), cloruro de polivinilo, poliestireno, poliácridamida en forma reticulada, nitrocelulosa o nylon y similares. El TF se puede aislar a continuación del soporte sólido en forma sustancialmente pura según técnicas inmunológicas estándar. Véase, en general, Harlow and Lane in *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Publications, New York (1988) y Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989).

[0062] Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para detectar TF humano nativo en una muestra biológica, particularmente TF nativo asociado con un coágulo de sangre. Entre las muestras biológicas de ejemplo se incluyen plasma sanguíneo, suero, saliva, orina, heces, secreciones vaginales, bilis, linfa, humores oculares, fluido cerebroespinal, medio de cultivo celular y tejido, particularmente tejidos vasculares, tales como tejido cardíaco. Las muestras se pueden obtener de forma adecuada de un mamífero que padece o es sospechoso de padecer una trombosis, preferiblemente reestenosis, asociada con, por ejemplo un procedimiento médico invasivo, tal como una cirugía cardiopulmonar con bypass; una enfermedad cardíaca, tal como infarto de miocardio, cardiomiopatía, enfermedad valvular cardíaca, angina inestable, o fibrilación arterial asociada con embolia; una coagulopatía, incluyendo coagulación intravascular diseminada, despliegue de un dispositivo, tal como un stent o catéter; choque (por ejemplo, síndrome de choque séptico), trauma vascular, enfermedad hepática, apoplejía cardíaca, tumores malignos (por ejemplo, carcinoma pancreático, ovárico, o célula pequeña de pulmón), lupus, eclampsia, enfermedad oclusiva perivascular y enfermedad renal.

[0063] Para dichos ensayos, un anticuerpo de la invención se puede marcar de forma detectable con un átomo o molécula adecuada, por ejemplo, yodo radioactivo, tritio, biotina o reactivo capaz de generar un producto detectable, tal como un anticuerpo antiidiotípico, unido a una enzima, tal como una enzima, tal β -galactosidasa o peroxidada de rábano picante, o una etiqueta fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o rodamina) según métodos conocidos. Después de contactar la muestra biológica con el anticuerpo marcado de forma detectable, cualquier anticuerpo no reaccionado se puede separar de la muestra biológica, se detecta el marcador (o producto) mediante métodos inmunológicos convencionales incluyendo ensayo de captura de anticuerpos, ensayo de sándwich de anticuerpos, RIA, ELISA, inmunoprecipitación, inmunoabsorción y similares (véase Harlow y Lane, supra; Ausubel et al. supra). Cualquier marcador (o producto) en exceso del detectado en una muestra de control adecuada es indicativo de la presencia de TF nativo, más particularmente un coágulo de sangre, en la muestra biológica. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden marcar de forma detectable para detectar, y preferiblemente cuantificar, TF

nativo según técnicas inmunológicas estándar, tales como ensayo de captura de anticuerpos, ELISA, ensayo de sándwich de anticuerpos, RIA, inmunoprecipitación, inmuoabsorción, y similares. En algunos casos, particularmente cuando se utiliza un tejido, la técnica inmunológica puede incluir la fijación de tejido con un reactivo conocido por mantener sustancialmente la conformación de la proteína (por ejemplo, formaldehído diluido). Véase, en general, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, (1989); Harlow and Lane in Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Publications, NY (1988).

[0064] Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para detectar y purificar células que expresan TF nativo, incluyendo fibroblastos, células del cerebro, células inmunes (por ejemplo, monocitos), epitelio, así como ciertas células malignas. Los métodos preferidos de detección y purificación de células incluyen métodos inmunológicos convencionales (por ejemplo, métodos de citometría de flujo, tales como FACS y “inmunospanning”). Las poblaciones sustancialmente puras de células que expresan TF nativo son útiles en entornos clínicos y de investigación, por ejemplo, para establecer dichas células como células cultivadas para cribar anticuerpos de unión de TF.

[0065] La memoria también describe kits de análisis y diagnóstico para la detección de TF nativo, particularmente TF humano nativo, en una muestra de análisis, especialmente un fluido corporal, tal como sangre, plasma, etc., o tejido tal como se ha descrito anteriormente. Un kit preferido incluye un anticuerpo de la invención marcado para su detección. El kit de diagnóstico se puede utilizar en cualquier formato inmunológicamente aceptable, tal como un formato ELISA para detectar la presencia o cantidad de TF nativo en la muestra biológica.

[0066] Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la invención. En los siguientes ejemplos y en otros puntos se hace referencia a los anticuerpos H36 y H36.D2. Esos anticuerpos son el mismo anticuerpo que H36.D2.B7, pero H36 deriva del clon madre, y H36.D2 se obtiene del clon primario, mientras que H36.D2.B7 se obtiene del clon secundario. No se han observado diferencias entre esos tres clones con respecto a la capacidad de inhibir TF u otras propiedades físicas.

EJEMPLO 1 – Preparación y clonación de anticuerpos monoclonales anti-rhTF. Se prepararon anticuerpos monoclonales contra rhTF tal y como sigue:

A. Inmunización y refuerzos

[0067] Se inmunizaron cinco ratones BALB/c hembras con 10 µg de rhTF lipidado y purificado en cada uno. Inicialmente se sensibilizaron los ratones intraperitonealmente utilizando adyuvante Titermax de Hunter. Se administraron tres refuerzos finales en NaCl al 0,85%. Los refuerzos fueron 2, 5,5, y 6,5 meses después de la sensibilización inicial. Todos los refuerzos se administraron intraperitonealmente, excepto el primero que fue subcutáneo. Se administró el refuerzo final 3 días antes de la fusión y se administraron 20 µg.

B. Fusión de linfocitos de bazo de ratón con células de mieloma de ratón

[0068] Se fusionaron linfocitos del bazo de un ratón BALB/c inmunizado con rhTF con células de mieloma de ratón X63-Ag8.653 utilizando PEG 1500. Después de la exposición a PEG, se incubaron las células durante una hora en suero bovino fetal inactivado con calor a 37°C. A continuación, se resuspendieron las células fusionadas en RPMI 1640 y se incubaron durante toda la noche a 37°C con CO₂ al 10%. Al día siguiente se pusieron las células en placas utilizando RPMI 1640 y se complementaron con sobrenadante de cultivo de macrófago.

C. Desarrollo de ELISA

[0069] Se recubrieron las placas para el ensayo de ELISA con 100 microlitros de factor de tejido recombinante (0,25 µg/ml) en un tampón basado en carbonato. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Se bloquearon las placas con BSA, se lavaron, y a continuación se añadieron las muestras de análisis y los controles. Se detectó la unión antígeno/anticuerpo mediante la incubación de la placa con conjugado de HRP anti-ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y a continuación la utilización de un sistema de sustrato de ABTS peroxidasa (Kirkegaard and Perry Laboratories). Se leyó la absorbancia en un lector de placas automático a una longitud de onda de 405 nm.

D. Estabilización de líneas celulares de hibridoma de rhTF

[0070] Dos semanas después de la fusión, se inició el cribado de colonias de hibridoma mediante ELISA de rhTF específico. El cribado para nuevas colonias continuó durante tres semanas. Se analizaron los clones positivos cada una o dos semanas por la producción de anticuerpo continuada hasta que se congelaron quince clones estables.

E. Clonación primaria y secundaria

[0071] Se realizó la clonación por dilución limitante sobre cada uno de los hibridomas estables positivos para obtener clones primarios. Se descongelaron las células, se desarrollaron en cultivo durante un período de tiempo corto, y a continuación se diluyeron desde 10 células/pocillo hasta 0,1 células/pocillo. Se analizaron los clones primarios mediante ELISA de anti-rhTF y se expandieron y se congelaron de cinco a seis clones positivos.

[0072] Se obtuvo el clon secundario de anti-rhTF, H36.D2.B7, a partir del clon primario, H36.D2, se preparó y se guardó en nitrógeno líquido tal y como se describe anteriormente. Se prepararon cuatro diluciones diferentes, 5 células/pocillo, 2 células/pocillo, 1 célula/pocillo, 0,5 células/pocillo del clon primario en placas de microtitulación de 96 pocillos para comenzar la clonación secundaria. Se diluyeron células en medios de cultivo de tejido IMDM que contenía los siguientes aditivos: suero bovino fetal al 20% (FBS), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, GMS-S al 1%, NaHCO₃ al 0,075%. Para determinar clones que secretan anticuerpo anti-rhTF, se extrajeron los sobrenadantes de cinco pocillos individuales de la placa de microtitulación de 0,2 células/pocillo después de dos semanas de crecimiento y se analizaron por la presencia de anticuerpo anti-rhTF mediante ensayos ELISA tal y como se describe anteriormente. Los cinco clones mostraron resultados positivos en el ensayo ELISA, siendo el H36.D2.B7 el mejor productor de anticuerpos. Se adaptaron todos los cinco clones y se expandieron en medio RPMI que contenía los siguientes aditivos: FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, GMS-S al 1%, NaHCO₃ al 0,075%, y 0,013 mg/ml de ácido oxalacético. Se purificó H36.D2.B7 mediante cromatografía de afinidad de Proteína A a partir del sobrenadante del cultivo celular y se analizó por su capacidad de inhibir TF:VIIa en un ensayo de activación de FX. Los resultados indicaron que H36.D2.B7 tenía la misma inhibición que el anticuerpo de H36.D2. Se guardaron todas las células en nitrógeno líquido.

F. Aislamiento de ARN total de H36.D2.B7

[0073] Se aislaron 269 µg de ARN total de $2,7 \times 10^5$ células de hibridoma H36.D2.B7. Se realizó el aislamiento de ARN total tal y como se describe en el protocolo de RNeasy Midi Kits de Qiagen. Se guardó la muestra de ARN en agua a -20°C hasta que se necesitó.

G. Síntesis de ADNc y clonación de regiones variables del gen de H36.D2.B7

[0074] Para obtener la primera cadena de ADNc, se preparó una mezcla de reacción que contenía 5 µg de ARN total aislado como se indica anteriormente, cebadores reversos JS300 (todos los cebadores están identificados a continuación) para la cadena pesada (HC) y OKA 57 para la cadena ligera (LC), inhibidor de ARNasa, dNTP, DTT, y transcriptasa inversa superscript II, y se incubó a 42°C durante 1 hora. A continuación se incubó el tubo de reacción a 65°C durante 15 minutos para parar la transcripción. Después de enfriar, se añadieron cinco unidades de ARNasa H y se dejó incubar la reacción a 37°C durante 20 minutos. Se guardó la muestra de ADNc a -70°C hasta que se necesitó.

[0075] Se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) separadamente para clonar las regiones variables tanto de HC como de LC de anti-rhTF, H36.D2.B7 del ADNc producido como se indica anteriormente (en las Figuras 1A y 1B se describen las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de estas regiones variables de HC y LC). Se realizaron tres rondas de PCR. Ronda 1: se procesó la PCR durante 35 ciclos a 96°C, 53°C y 72°C utilizando el cebador hacia delante JS002 y cebador reverso JS300 para HC. Para la LC se utilizaron el cebador hacia delante JS009 y el cebador reverso OKA 57 y se procesó la PCR durante 35 ciclos a 96°C, 63°C y 72°C. Ronda 2: se procesó la PCR tanto de HC como de LC igual que en la Ronda 1 con la excepción de que se utilizó pMC-18 para cebador hacia delante de HC y pMC-15 para cebador hacia delante de LC. Ronda 3: se procesó la PCR durante 30 ciclos a 96°C, 60-65°C y 72°C utilizando cebadores H36HCF y H36HCR para HC. Para LC, se procesó la PCR durante 30 ciclos a 96°C, 58°C y 72°C utilizando cebadores H36LCF y H36LCR.

[0076] Se utilizaron los siguientes cebadores para clonación de regiones variables de H36.D2.B7 de HC y LC.

OKA 57:

5'-GCACCTCCAGATGTTAACTGCTC-3' (SEC ID N°: 17)

[0077] JS300:

5'-GAARTAVCCCTTGACCAGGC-3' (SEC ID N°: 18)

[0078] JS009:

5'-GGAGGCGGCGGTTCTGACATTGTGMTGWCMCARTC-3' (SEC ID N°: 19)

JS002:

5'-ATTCAGGCCAGCCGGCCATGGCCGARGTYCARCTKCARCARYC-3' (SEC ID N°: 20)

pMC-15:

5'-CCCGGGCCACCATGKCCCCWRCTCAGYTYCTKG-3' (SEC ID N°: 21)

pMC-18:

5'-CCCGGGCCACCATGGRATGSAGCTGKGMTATSCTC-3' (SEC ID N°: 22)

H36HCF:

5'-ATATACTCGCGACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAGATCCAGCTGCAGCAGTC-3' (SEC ID N°: 23)

H36HCR:

5'-GACCTGAATTCTAAGGAGACTGTGAGAGTGG-3' (SEC ID N°: 24)

H36LCF:

5'-TTAATTGATATCCAGATGACCCAGTCTCC-3' (SEC ID N°: 25)

H36LCR:

5 TAATCGTTTCGAAAAGTGTACTTACGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCC (SEC ID N°: 26)

en el que desde la SEC ID N°: 17 hasta la 26 anteriores: K es G o T; M es A o C; R es A o G; S es C o G; V es A, C o G; W es A o T; Y es C o T.

EJEMPLO 2 – Actividad de unión de Mabs de la invención

[0079] Se utilizaron los Mabs de la invención tal y como se preparan en el Ejemplo 1 anterior. Se expresó la molécula rhTF en E.coli y se purificó mediante cromatografía de inmunoafinidad según los procedimientos estándar (ver Harlow y Lane, *supra*; Ausubel et al. *supra*). Se determinaron las constantes de asociación (K_a) y de disociación (K_d) de Mab mediante ELISA y ensayos de resonancia de plasmones de superficie (es decir, BIACore) (ver por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*; Ausubel et al. *supra*; Altschuh et al., *Biochem.*, 31:6298 (1992); y el procedimiento BIACore descrito por Pharmacia Biosensor). Para ensayos BIACore, se inmovilizó rhTF sobre un chip biosensor según las instrucciones del fabricante. Se determinaron las constantes para cada Mab a cuatro concentraciones de anticuerpo (0,125 nM, 0,25 nM, 0,5 nM, y 1 nM).

[0080] Se determinaron las concentraciones de proteína mediante ensayo estándar (M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72:248 (1976)) utilizando Albúmina Sérica Bovina como patrón y un reactivo colorante disponible comercialmente (Bio-Rad).

[0081] La Figura 2 muestra las constantes de asociación y disociación para cada Mab anti-rhTF. Mab H36 mostró la mayor velocidad de asociación ($K_a = 3,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) y la menor velocidad de disociación ($K_d = 3,2 \times 10^{-11} \text{ M}$) de cualquiera de los Mabs anti-rhTF analizados.

EJEMPLO 3 – Ensayo de sustrato específico de FXa

[0082] En general, los experimentos descritos en la presente invención se realizaron utilizando rhTF lipidado con fosfatidilcolina (0,07 mg/ml) y fosfatidilserina (0,03 mg/ml) en una proporción 70/30 p/p en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% durante 30 minutos a 37°C. Se produjo una solución madre de complejo TF:VIIa preformado mediante la incubación de 5 nM del rhTF lipidado y 5 nM de FVIIa durante 30 minutos a 37°C. Se alícuotó el complejo TF:VIIa y se guardó a -70°C hasta que se necesitó. Se obtuvieron los factores humanos VII, VIIa y FX purificados de Enzyme Research Laboratories, Inc. Se utilizó el siguiente tampón para todos los ensayos de FXa y FVIIa: Hepes-NaOH 25 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1%, pH 7,5.

[0083] Se cribaron los Mabs por la capacidad de bloquear la activación de FX a Fxa mediada por TF:VIIa. Se determinó la activación de FX en dos pasos discontinuos. En el primer paso (activación de FX), se ensayó la conversión de FX en FXa en presencia de Ca^{+2} . En el segundo paso (ensayo de actividad de Fxa), se detuvo la activación de FX mediante EDTA y se determinó la formación de FXa utilizando un sustrato cromogénico específico de FXa (S-2222). Los cromógenos S-2222 y S-2288 (ver más adelante) se obtuvieron de Chromogenix (distribuido por Pharmacia Hepar Inc.). Se realizó la activación de FX en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml mediante la incubación de la mezcla de reacción con TF:VIIa 0,08 nM, ya sea preincubado con un anticuerpo anti-rhTF o un tampón de control. Se incubó posteriormente la mezcla de reacción durante 30 minutos a 37°C, a continuación se añadió FX 30 nM seguido de una incubación adicional durante 10 minutos a 37°C. Se determinó la actividad de FXa en placas de titulación de 96 pocillos. Se extrajeron veinte microlitros de muestra del paso uno y se mezclaron con un mismo volumen de EDTA (500 nM) en cada pocillo, seguido de la adición de 0,144 ml de tampón y 0,016 ml de sustrato S-2222 5mM. Se dejó que se incubara la mezcla de reacción durante unos 15-30 minutos adicionales a 37°C. A continuación se detuvieron las mezclas de reacción con 0,05 ml de ácido acético al 50%, después del cual, se registró la absorbancia a 405 nm de cada mezcla de reacción. Se calculó la inhibición de la actividad de TF:VIIa a partir de los valores de $\text{DO}_{405\text{nm}}$ en las muestras experimentales (más anticuerpo) y de control (sin anticuerpo). En algunos experimentos, se añadieron simultáneamente un anticuerpo anti-hTF, TF/VIIa, y FX para detectar la competición de unión. La Figura 3 muestra que el MAb H36.D2 (en negrita) inhibió la actividad de TF:VIIa hacia FX en un grado significativamente mayor (95%) que otros Mabs anti-rhTF analizados.

EJEMPLO 4 – Ensayo de sustrato específico de FVIIa

[0084] Se cribaron adicionalmente los Mab mediante un ensayo específico de FVIIa. En este ensayo, se incubó en primer lugar rhTF lipidado 5 nM con tampón (control) o anticuerpo 50 nM (experimental) en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 30 minutos a 37°C, a continuación se mezcló con FVIIa humano purificado 5 nM (VT= 0,192 ml), seguido de una incubación de 30 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron a cada pocillo ocho microlitros de una solución madre 20 mM del sustrato específico de FVIIa S-2288 (concentración final, 0,8 mM). Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó durante una hora a 37°C. A continuación, se midió la absorbancia a 405 nm después de detenerla con 0,06 ml de ácido acético al 50%. El porcentaje de inhibición de la actividad de TF/VIIa se calculó a partir de los valores de $\text{DO}_{405\text{nm}}$ de las muestras experimentales y de control.

[0085] La figura 4 muestra que el anticuerpo H36 no bloqueaba significativamente la actividad de TF/VIIa hacia el sustrato S-2288 cuando el anticuerpo se preincubaba con TF (antes de la adición de VIIa) o se añadía a TF preincubado con VIIa (antes de añadir el anticuerpo). Esto indica que H36 no interfiere con la interacción (unión) entre TF y FVIIa, y que H36 tampoco inhibe la actividad de TF:VIIa hacia un sustrato peptídico.

5

EJEMPLO 5 – Ensayo del tiempo de protrombina (PT)

[0086] El plasma sanguíneo calcificado coagulará en unos segundos después de la adición de tromplastina (TF); un fenómeno denominado el “tiempo de protrombina” (PT). Un PT prolongado es habitualmente un indicador útil de la actividad de anticoagulación (véase, por ejemplo, Gilman et al. supra).

10

[0087] El anticuerpo H36.D2 se investigó por la capacidad de afectar al PT según los métodos estándar utilizando plasma humano disponible comercialmente (Control Ci-Trol, Nivel I obtenido de Baxter Diagnostics Inc.). Las reacciones de coagulación se iniciaron mediante la adición de rhTF lipídado en presencia de Ca^{++} . El tiempo de coagulación de monitorizó mediante un controlador del tiempo de coagulación automatizado (MLA Electra 800). Los ensayo de PT se iniciaron mediante la inyección de 0,2 ml de rhTF lipídado (en un tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que contiene BSA al 0,1%, CaCl_2 14,6 mM, 0,07 mg/ml de fosfatidilcolina, y 0,03 mg/ml de fosfatidilserina) en cubetas de doble pocillo de plástico. Las cubetas contenían cada una 0,1 ml del plasma preincubado con 0,01 ml de tampón (muestra de control) o anticuerpo (muestra experimental) durante 1-2 minutos. La inhibición de coagulación mediada por TF por el anticuerpo H36.D2 se calculó utilizando una curva estándar de TF en la que el log [TF] se representó frente al log del tiempo de coagulación.

15

20

[0088] La figura 5 muestra que el anticuerpo H36.D2 inhibe sustancialmente la coagulación iniciada por TF en plasma humano. El anticuerpo H36.D2 incrementó el tiempo de PT significativamente, mostrando que el anticuerpo es un inhibidor efectivo de la coagulación iniciada por TF (hasta aproximadamente una inhibición del 99%).

25

EJEMPLO 6 - FX y el anticuerpo H36.D2 compiten por la unión al complejo TF:VIIa

[0089] Los experimentos de competición se realizaron entre TF/VIIa, FX y el anticuerpo H36.D2. La figura 6A ilustra los resultados de un experimento en que un complejo TF/VIIa preformado (0,08 nM) se preincubó a 37°C durante 30 minutos en tampón incluyendo 0,02 nM, 0,04 nM, 0,08 nM y 0,16 nM del anticuerpo monoclonal H36.D2, respectivamente. A continuación, se añadió FX (30 nM) a la mezcla de TF/VIIa y anticuerpo H36.D2 y la mezcla se dejó incubar durante 10 minutos adicionales a 37°C. La activación de FX se detuvo con EDTA tal como se ha descrito previamente. De este modo, el FXa producido se determinó mediante el ensayo específico de FXa descrito en el Ejemplo 3 anterior.

30

35

[0090] La figura 6B muestra los resultados de un experimento realizado en la misma línea descrita anteriormente, a excepción de que el anticuerpo H36.D2, TF:VIIA preformado, y FX se añadieron simultáneamente para iniciar el ensayo de activación de FX.

[0091] Los datos establecidos en las figuras 6A y 6B muestran que el anticuerpo H36.D2 y FX compiten por la unión al complejo TF/VIIa preformado.

40

EJEMPLO 7 – Inhibición de la actividad de TF en cultivo celular

[0092] J-82 es una línea celular de carcinoma de vejiga humano (disponible de ATCC) que expresa de manera abundante TF humano nativo como proteína de la superficie celular. Para ver si el anticuerpo H36.D2 podía evitar que FX se uniera a TF nativo expresado en la superficie celular, se realizó un ensayo de activación de FX de J-82 en placas de microtitulación en presencia de FVII (véase D.S. Fair et al., J. Biol. Chem., 262:11692 (1987)). A cada pocillo, se añadieron 2×10^5 células y se incubaron con 50 ng de FVII, tampón (muestra de control) o el anticuerpo anti-TF (muestra experimental) durante 2 horas a 37°C. Después, cada pocillo se lavó suavemente con tampón y se añadieron 0,3 ml de FX (0,05 mg/ml) a cada pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente. En algunos casos, el anticuerpo se añadió a la vez que FX para detectar la competición de unión por el TF nativo. Después de esto, se extrajeron alícuotas de 0,05 ml y se añadieron a nuevos pocillos en una placa de titulación de 96 pocillos que contenía 0,025 ml de EDTA 100 mM. La actividad de FXa se determinó mediante un ensayo específico de FXa tal como se describe en ejemplo 3 anterior. La inhibición de la actividad de TF en la superficie de las células J-82 se calculó a partir de la $\text{DO}_{405 \text{ nm}}$ en ausencia (muestra de control) y presencia del anticuerpo (muestra experimental).

45

50

[0093] La figura 7 muestra que el anticuerpo H36.D2 se unió a TF nativo expresado en membranas celulares de J-82 e inhibió la activación de FX mediada por TF. Estos resultados indican que el anticuerpo compite con FX por la unión a TF nativo expresado en la superficie celular. Tomados con los datos del ejemplo 8 a continuación, los resultados también muestran que el anticuerpo H36.D2 se puede unir a un epítipo conformacional en TF nativo en una membrana celular.

55

60

EJEMPLO 8 – Unión específica del anticuerpo H36.D2 a rhTF nativo

[0094] La evaluación de la unión de H36.D2 a rhTF nativo y no nativo se realizó mediante un ensayo de transferencia de puntos (dot) simplificado. Específicamente, se diluyó rhTF hasta 30 $\mu\text{g/ml}$ en cada uno de los siguientes tres tampones: 10 mM Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y urea 8 M; y Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, urea 8 M y ditiotreitól 5 mM. La incubación en el tampón de Tris mantiene el rhTF en forma nativa, mientras que el tratamiento con urea 8 M y ditiotreitól 5 mM produce rhTF no nativo (desnaturalizado). Cada muestra se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se

65

prehumectó una membrana Millipore Immobilon (sección de 7x7cm) con metanol, seguido de Tris 25 mM, pH 10,4, incluyendo metanol al 20%. Después de secar las membranas al aire, se aplicaron 0,5 µl, 1 µl, y 2 µl de cada muestra (30 µg/ml) a la membrana y se secaron al vacío. Después de bloquear la membrana mediante PBS que contenía leche desnatada al 5% (p/v) y NP-40 al 5% (v/v), la membrana se sondó con el anticuerpo H36.D2, seguido de la incubación con un conjugado de peroxidasa e IgG anti-ratón de cabra (obtenido de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Después de la incubación con reactivos de transferencia Western ECL según las instrucciones del fabricante (Amersham), la membrana se envolvió con una película de plástico (Saran Wrap) y se expuso a una película de rayos X varias veces.

[0095] La figura 8A muestra que el Mab H36.D2 se une a un epítipo conformacional en TF nativo en presencia de tampón Tris o tampón Tris con urea 8M (carriles 1 y 2). El autorradiograma se expuso durante 40 segundos. Sin embargo, cuando se desnaturizó el TF nativo con urea 8M y DTT 5 mM, la unión de H36.D2 se redujo significativamente o se eliminó (carril 3). La figura 8B muestra un autorradiograma sobreexpuesto que muestra la unión residual del anticuerpo H36.D2 a rhTF no nativo (es decir, desnaturizado). La sobreexposición fue de aproximadamente 120 segundos. El tratamiento con urea 8M sola dio lugar probablemente a una desnaturalización sólo parcial del rhTF nativo, ya que los dos enlaces disulfuro en TF no se reducen. También es posible que el TF parcialmente desnaturizado se pueda replegar a la conformación nativa durante un proceso de transferencia posterior cuando se extrae la urea. Estos resultados también diferencian claramente los anticuerpos preferidos de la invención que no se unen a TF desnaturizado de anticuerpos previamente descritos que no se unen selectivamente a un epítipo conformacional y se unen a TF desnaturizado (véase la patente de Estados Unidos 5,437,864 donde en la Figura 18 el análisis de transferencia Western muestra la unión a TF desnaturizado mediante SDS).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0096]

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE: Wong, Hing C.

Jiao, Jin-an

Esperanza, Nieves

Lawrence, Luepschen

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTICUERPOS PARA INHIBIR LA COAGULACIÓN DE LA SANGRE Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 26

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, LLP

(B) CALLE: 130 Water Street

(C) CIUDAD: Boston

(D) ESTADO: MA

(E) PAÍS: Estado Unidos

(F) CP: 02109

(v) FORMA DE LECTURA POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Diskette

(B) ORDENADOR: IBM Compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: DOS

(D) SOFTWARE: FastSEQ Version 1.5

(vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE SOLICITUD:

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE SOLICITUD:

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Corless, Peter F

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33,860

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 46943-PCT

(ix) INFORMACIÓN DE COMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: 617-523-3400

(B) TELEFAX: 617-523-6440

(C) TELEX:

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:1:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 321 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) ORIGEN:

- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:1:

20 GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCTGCCTCC CAGTCTGCAT CTCTGGGAGA AAGTGTCCACC 60
 ATCACATGCC TGGCAAGTCA GACCATTGAT ACATGGTTAG CATGGTATCA GCAGAAACCA 120
 GGGAAATCTC CTCAGTCCT GATTTATGCT GCCACCACT TGGCAGATGG GTTCCCATCA 180
 AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGCACAAAA TTTTCTTTCA AGATCAGCAG CCTACAGGCT 240
 GAAGATTTTG TAAATTATTA CTGTCAACAA GTTTACAGTT CTCCATTAC GTTCGGTGCT 300
 GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 321

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 30 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 35 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
 (vi) ORIGEN:

- 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:2:

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

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 351 pares de bases
 60 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) ORIGEN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:3:

5
 GAGATCCAGC TGCAGCAGTC TGGACCTGAG CTGGTGAAGC CTGGGGCTTC AGTGCAGGTA 60
 TCCTGCAAGA CTTCTGGTTA CTCATTCAC GACTACAACG TGTAAGGGT GAGGCAGAGC 120
 CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGATAT ATTGATCCTT ACAATGGTAT TACTATCTAC 180
 GACCAGAACT TCAAGGGCAA GGCCACATTG ACTGTTGACA AGTCTTCCAC CACAGCCTTC 240
 10 ATGCATCTCA ACAGCCTGAC ATCTGACGAC TCTGCAGTTT ATTTCTGTGC AAGAGATGTG 300
 ACTACGGCCC TTGACTTCTG GGGCCAAGGC ACCACTCTCA CAGTCTCCTC A 351

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:4:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 117 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

25 (vi) ORIGEN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:4:

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

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

55 (vi) ORIGEN:

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:5:

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp
 1 5

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) ORIGEN:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:6:

10

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) ORIGEN:

25

- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:7:

30

Gln Gln Val Tyr Ser Ser Pro Phe Thr
1 5

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) ORIGEN:

45

- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:8:

50

Thr Asp Tyr Asn Val Tyr
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:9:

55

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

60

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) ORIGEN:

65

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:9:

5 Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:10:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

20

(vi) ORIGEN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:10:

25 Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:11:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

40

(vi) ORIGEN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:11:

CTGGCAAGTC AGACCATTGA T 21

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

55

(vi) ORIGEN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:12:

60

GCTGCCACCA ACTTGGCAGA T 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:13:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) ORIGEN:

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:13:

CAACAAGTTT ACAGTTCTCC ATTCACGT 28

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) ORIGEN:

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:14:

ACTGACTACA ACGTGTAC 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 51 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) ORIGEN:

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:15:

TATATTGATC CTTACAATGG TATTACTATC TACGACCAGA ACTTCAAGGG C 51

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:16:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) ORIGEN:

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:16:

65 GATGTGACTA CGGCCCTTGA CTTC 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:17:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 23 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) ORIGEN:

- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:17:

GCACCTCCAG ATGTAACTG CTC 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:18:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) ORIGEN:

- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:18:

GAARTAVCCC TTGACCAGGC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:19:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 35 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) ORIGEN:

- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:19:

GGAGGCGGCG GTTCTGACAT TGTGMTGWCM CARTC 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:20:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 45 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) ORIGEN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:20:

ATTCAGGCC CAGCCGGCCA TGGCCGARGT YCARCTKCAR CARYC 45

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) ORIGEN:

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:21:

CCCGGGCCAC CATGKCCCCW RCTCAGYTYC TKG 33

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) ORIGEN:

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:22:

CCCGGGCCAC CATGGRATGS AGCTGKGTMA TSCTC 35

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 52 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) ORIGEN:

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:23:

ATATACTCGC GACAGCTACA GGTGTCCACT CCGAGATCCA GCTGCAGCAG TC 52

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60

65

5	<ul style="list-style-type: none"> (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (iii) HIPOTÉTICO: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (v) TIPO DE FRAGMENTO: (vi) ORIGEN: 	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:24:	
10	GACCTGAATT CTAAGGAGAC TGTGAGAGTG G	31
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:25:	
15	<ul style="list-style-type: none"> (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: <ul style="list-style-type: none"> (A) LONGITUD: 29 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) CADENA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal 	
20	<ul style="list-style-type: none"> (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (iii) HIPOTÉTICO: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (v) TIPO DE FRAGMENTO: (vi) ORIGEN: 	
25	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:25:	
	TTAATTGATA TCCAGATGAC CCAGTCTCC	29
30	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:26:	
35	<ul style="list-style-type: none"> (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: <ul style="list-style-type: none"> (A) LONGITUD: 45 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) CADENA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal 	
40	<ul style="list-style-type: none"> (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (iii) HIPOTÉTICO: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (v) TIPO DE FRAGMENTO: (vi) ORIGEN: 	
45	(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:26:	
	TAATCGTTCG AAAAGTGTAC TTACGTTTCA GCTCCAGCTT GGTCC	45

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo o fragmento del mismo que se une a factor tisular (“TF”) humano, en el que el anticuerpo o fragmento comprende:
 - 5 (i) regiones hipervariables de cadena ligera CDR1, CDR2, y CDR3, en las que:
CDR1 comprende la secuencia de SEC ID NO: 5;
CDR2 comprende la secuencia de SEC ID NO: 6; y
CDR3 comprende la secuencia de SEC ID NO: 7;
y
 - 10 (ii) regiones hipervariables de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3, en las que:
CDR1 comprende la secuencia de SEC ID NO: 8;
CDR2 comprende la secuencia de SEC ID NO: 9; y
CDR3 comprende la secuencia de SEC ID NO: 10.
- 15 2. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo monoclonal.
3. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo quimérico.
- 20 4. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo humanizado.
- 25 5. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena ligera que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 y/o una región variable de cadena pesada que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4.
- 30 6. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 y/o una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4.
- 35 7. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región constante humana.
8. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo de cadena sencilla.
- 40 9. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la afinidad de unión del anticuerpo o fragmento para un TF humano es igual o superior a la del anticuerpo monoclonal H36.D2.B7 que es producido por el hibridoma que se deposita con la ATCC bajo el número de acceso HB-12255.
- 45 10. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento tiene una constante de asociación para TF humano de por lo menos aproximadamente $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.
- 50 11. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la afinidad de unión del anticuerpo o fragmento para un TF humano sobre TF humano desnaturalizado es igual o superior a la del anticuerpo monoclonal H36.D2.B7 que es producido por el hibridoma que se deposita con la ATCC bajo el número de acceso HB-12255.
- 55 12. Anticuerpo que se une a factor tisular (“TF”) humano, en el que el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal H36.D2.B7 que es producido por el hibridoma que se deposita con la ATCC bajo el número de acceso HB-12255.
13. Anticuerpo humanizado que se une a factor tisular (“TF”) humano, en el que el anticuerpo es un derivado humanizado del anticuerpo según la reivindicación 12.
- 60 14. Método de purificación de factor tisular (“TF”) humano a partir de una muestra biológica, comprendiendo el método poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Método para detectar factor tisular (“TF”) humano en una muestra biológica, comprendiendo el método poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 65 16. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para utilizar en la inhibición de la coagulación de la sangre en un mamífero.
17. Utilización de un anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la fabricación de un medicamento para inhibir la coagulación de la sangre en un mamífero.

- 5 18. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 16, o utilización según la reivindicación 17, en que el mamífero padece o es sospechoso de tener una trombosis, o el mamífero padece o es susceptible a una reestenosis asociada con un procedimiento médico invasivo, o el mamífero padece una patología tromboembólica asociada con una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad neoplásica, o utilización de un agente trombolítico.
19. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 16, o utilización según la reivindicación 17, en que el mamífero es un humano.
- 10 20. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 16, o utilización según la reivindicación 17, en que el anticuerpo se administra combinado con una composición antiplaquetaria, una composición trombolítica o una composición anticoagulante.
- 15 21. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 16, o utilización según la reivindicación 17, en que el anticuerpo se administra combinado con heparina, hirudina, Bivalirudina, Abciximab, activador de plasminógeno de tejido, estreptoquinasa, o uroquinasa.
22. Anticuerpo o fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para utilizar como medicamento.
- 20 23. Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a factor tisular ("TF") humano, en el que:
(a) el ácido nucleico codifica una región variable de cadena ligera y comprende las secuencias de polinucleótidos de SEC ID NOs: 11, 12, y 13; y (b) el ácido nucleico codifica una región variable de cadena pesada y comprende las secuencias de polinucleótidos de SEC ID NOs: 14, 15, y 16.
- 25 24. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 23, que comprende la secuencia de polinucleótidos de SEC ID NO: 1 y la secuencia de polinucleótidos de SEC ID NO: 3.
25. Ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 30 26. Vector que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25.
27. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 26.
- 35 28. Célula huésped que comprende (a) un primer vector que comprende un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a factor tisular ("TF") humano y comprende las secuencias de polinucleótidos de SEC ID NOs: 11, 12, y 13; y (b) un segundo vector que comprende un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a factor tisular ("TF") humano y comprende las secuencias de polinucleótidos de SEC ID NOs: 14, 15, y 16.

H36.D2.B7 REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA ANTI-FACTOR TISULAR

GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTGCCCTCCAGTCTGCCATCTCTGGGAGAAAGTGTCACCATCACATGC
 D I Q M T Q S P A S Q S A S L G E S V T I T C
CTGGCAAGTCAGACCATTGATACATGGTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTC
L A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L
 CTGATTTATGCTGCCACCAACTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACA
 L I Y A A T N L A D G V P S R F S G S G S G T
 AAATTTCTTTCAAGATCAGCAGCCCTACAGGCTGAAGATTTTGTAATAATTACTGTCAACAAGTTTAC
 K F S F K I S S L Q A E D F V N Y Y C Q Q V Y
AGTTCTCCATTCACGTTCTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
S S P F T F G A G T K L E L K

* REGIONES CDR SUBRAYADAS .

FIG. 1A

H36.D2.B7 REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA ANTI-FACTOR TISULAR

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGGTATCCTGCAAG
 E I Q L Q Q Q S G P E L V K P G A S V Q V S C K
 ACTTCTGGTFACTCATTCACTGACTACAAACGTGTACTGGGTGAGGCAGAGCCCATGGAAAGAGCCTTGAG
 T S G Y S F T D Y N V Y W V R Q S H G K S L E
 TGGATTGGATATATGATCCCTTACAATGGTATTACTATCTACGACCAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACA
W I G Y I D P Y N G I T I Y D Q N F K G K A T
 TTGACTGTTGACAAAGTCTTCCACCACAGCCTTCATGCATCTCAACAGCCTGACATCTGACGACTCTGCA
 L T V D K S S T T A F M H L N S L T S D D S A
 GTTTATTCTGTGCAAGAGATGTGACTACGGCCCTTGACTTCTGGGGCCCAAGGCACCCTCTCACAGTC
V Y F C A R D V T T A L D F W G Q G T T L T V
 TCCTCA
 S S

* REGIONES CDR SUBRAYADAS

FIG. 1B

ANTICUERPO	Kd APARENTE M ⁻¹	Kd APARENTE M
POR ELISA		
D2	5.2 X 10 ⁹	1.9 X 10 ⁻¹⁰
I47	6.5 X 10 ⁹	1.5 X 10 ⁻¹⁰
K73	9.8 X 10 ⁹	1.0 X 10 ⁻¹⁰
K80	2.3 X 10 ⁹	4.3 X 10 ⁻¹⁰
L102	2.5 X 10 ⁹	4.0 X 10 ⁻¹⁰
L133	1.7 X 10 ⁹	5.9 X 10 ⁻¹⁰
POR BIACore		
H36	3.1 X 10 ¹⁰	3.2 X 10 ⁻¹¹
I43	2.3 X 10 ⁹	4.3 X 10 ⁻¹⁰
I47	3.2 X 10 ⁹	3.1 X 10 ⁻¹⁰
L133	4.6 X 10 ⁹	2.2 X 10 ⁻¹⁰
M107	1.1 X 10 ⁹	9.1 X 10 ⁻¹⁰

FIG. 2

NOMBRE DE ANTICUERPO	% DE INHIBICIÓN DE ANTICUERPO PREINCUBADO CON TF/MIIa
D1	0
D1B	1
H31	4
<u>H36</u>	<u>95</u>
I43	1
J131	7
K80	0
K82	0
K87	1
L97B	7
L101	0
L102	0
L105	0
L133	0
M5	1
M107	34

FIG. 3

NOMBRE DE ANTICUERPO	% DE INHIBICIÓN DE TF PREINCUBADO CON ANTICUERPO ANTES DE LA ADICIÓN DE VIIa	% DE INHIBICIÓN DE TF PREINCUBADO CON VIIa ANTES DE LA ADICIÓN DE ANTICUERPO
D1	15	nd
D1B	48	12.7
H31	64	21
H36	0	0
I43	68	55
J131	38	11
K80	12	nd
K82	0	nd
K87	0	nd
L96	0	nd
L101	38	11
L102	14	nd
L105	4	nd
L133	13	nd
M5	0	nd
M107	0	nd

FIG. 4

[rhTF],nM	[H36.D2],nM	PROPORCIÓN MOLAR H36.D2/rhTF	TIEMPO DE COAGULACIÓN (SEGUNDOS)	% DE INHIBICIÓN DE LA FUNCIÓN DE rhTF
0.0048	0	0	102.3	0
	1.61	335.4	114.3	31.3
	3.23	670.8	121.3	45.8
0.023	0	0	77.6	0
	1.61	70.0	85.3	52.2
	3.23	140.0	91.1	65.2
	6.45	280.4	99.6	73.9
0.092	0	0	49.3	0
	3.23	35.1	65.8	65.2
	6.45	70.1	88.5	90.2
	12.90	140.2	113.3	95.7
0.46	0	0	32.6	0
	6.45	14.0	52.7	82.4
	12.90	28.0	80.2	96.7
	32.30	70.2	117.9	99.3
2.30	0	0	23.9	0
	16.10	7.0	47.1	94.4
	32.30	14.0	95.2	99.7
	64.50	28.0	115.3	99.9
11.52	0	0	22.2	0
	16.10	1.4	30.2	93.4
	32.30	2.8	46.0	98.8
	64.50	5.6	87.6	99.9
	161.30	14.0	114.0	100.0

FIG. 5

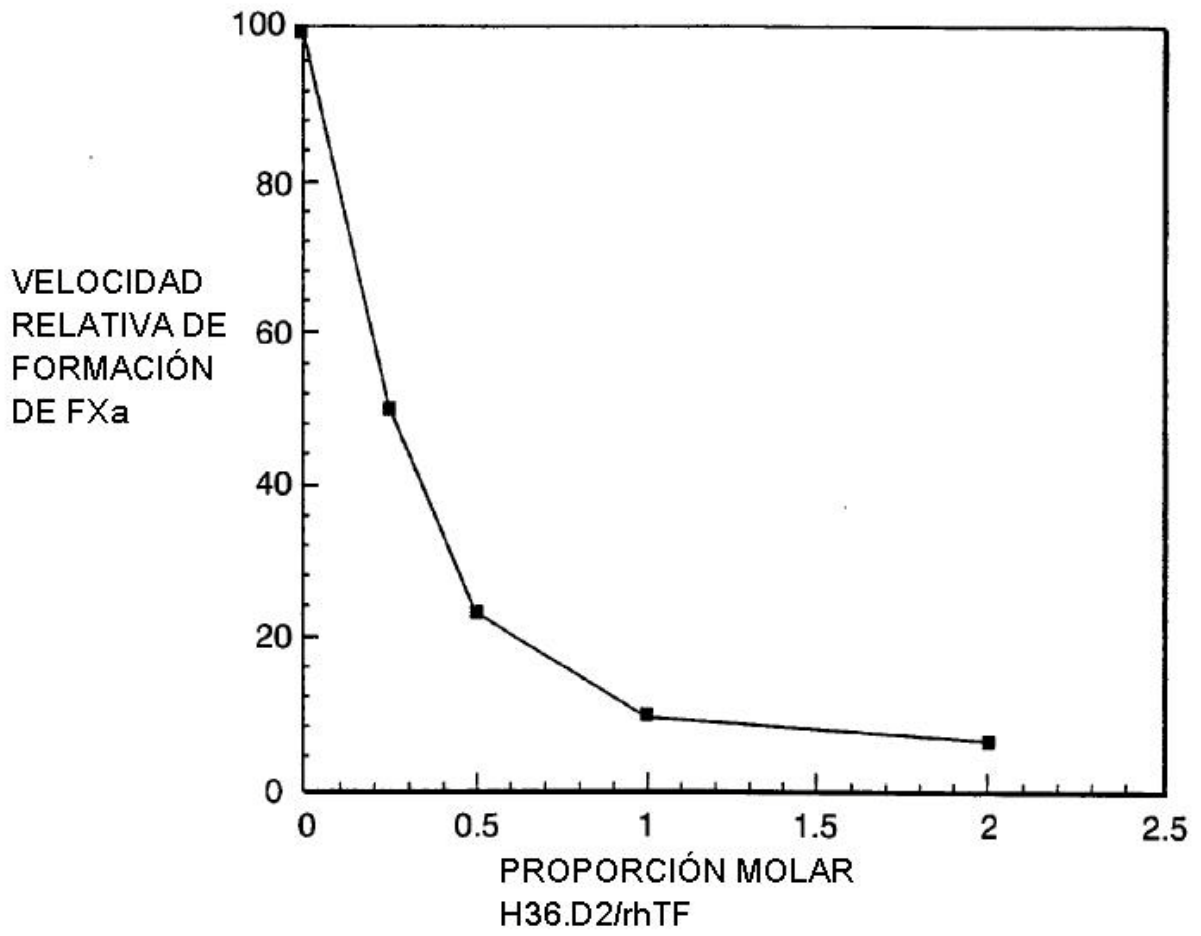


FIG. 6A

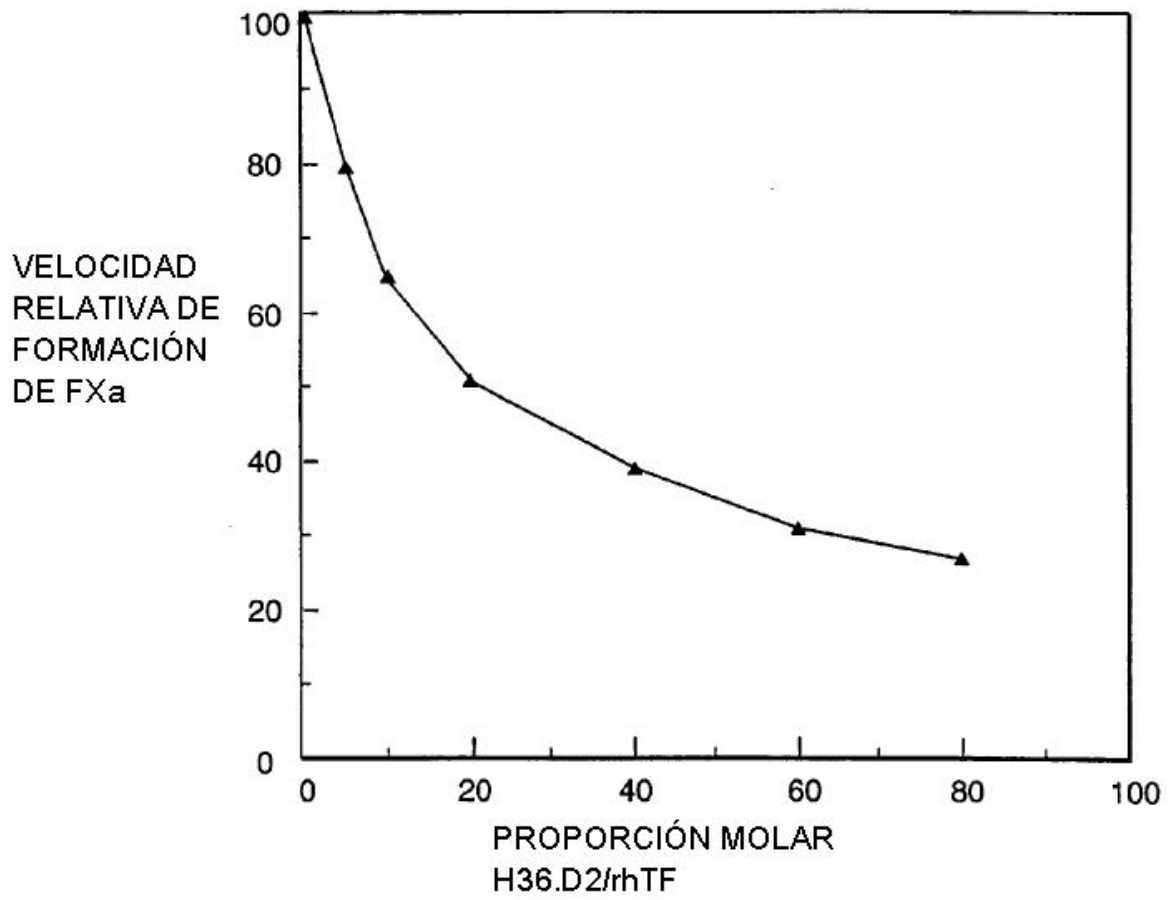


FIG. 6B

CONCENTRACIÓN DE H36.D2 (ng)	% DE INHIBICIÓN CELULAS (TF/FVII) Y H36.D2 PREINCUBADOS ANTES DE LA ADICIÓN DE FX	% DE INHIBICIÓN FX Y H36.D2 SE AÑADEN SIMULTÁNEAMENTE A CÉLULAS (TF/FVII)
0	0	0
50	88	nd
100	92	nd
200	97	nd
800	nd	76
1600	nd	78
3200	nd	92

FIG. 7

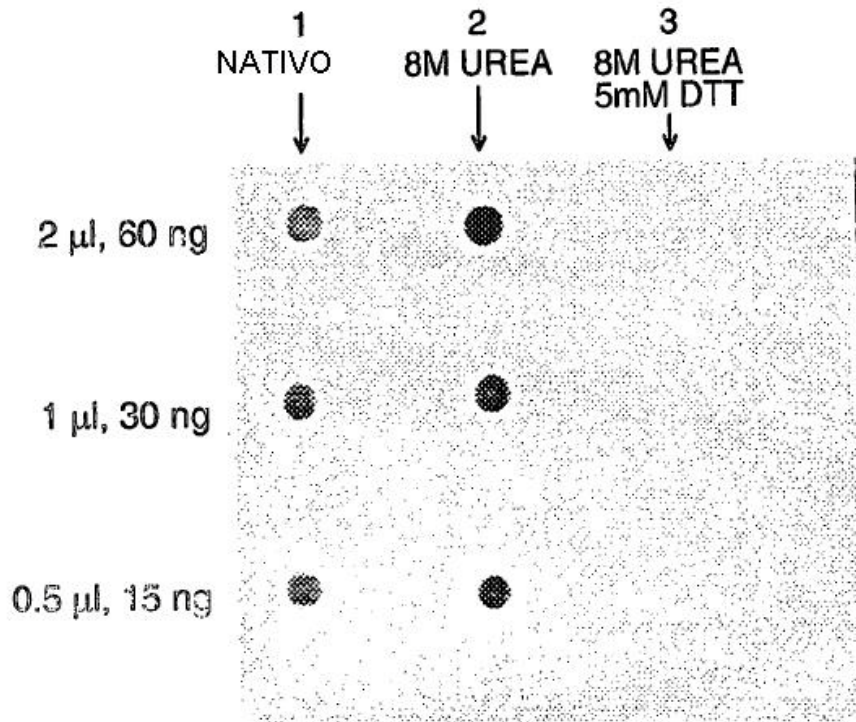


FIG. 8A

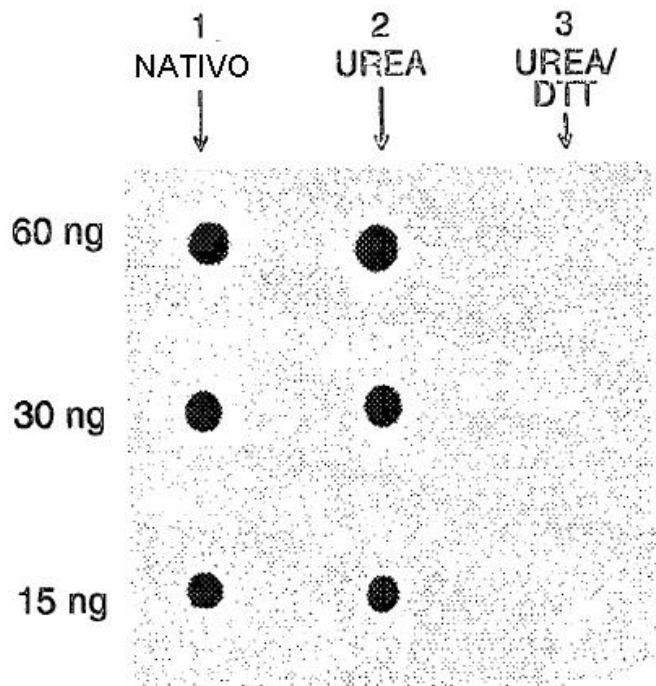


FIG. 8B