

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 047**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05778408 .4**
- 96 Fecha de presentación: **26.04.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1745076**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Anticuerpos específicos contra la glicoproteína VI y procedimientos de producción de estos anticuerpos**

30 Prioridad:
29.04.2004 US 566171 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2012

73 Titular/es:
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
2-9, KANDA-TSUKASACHO
CHIYODA-KU, TOKYO 101-8535, JP

72 Inventor/es:
TANDON, NARENDRA, NATH;
MATSUMOTO, YUTAKA;
TAKIZAWA, HISAO y
OKUYAMA, KEIJI

74 Agente/Representante:
ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 389 047 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 específicos contra la glicoproteína VI y procedimientos de producción de estos anticuerpos.

5 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad para la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/566.171, presentada el 29 de abril del 2004.

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a anticuerpos generados contra la glicoproteína VI (GPVI), fragmentos, o sus variantes de origen natural, de la membrana de las plaquetas, a métodos para producir los anticuerpos anti-GPVI y al uso de estos anticuerpos como agentes para la investigación e inmunoterapéuticos, en particular, como agentes terapéuticos para el tratamiento de la trombosis y de otras enfermedades vasculares.

15 Antecedentes de la invención

[0003] Las plaquetas son células sanguíneas pequeñas, anucleares, esenciales para el control hemostático y la cicatrización de heridas. En condiciones normales las plaquetas circulantes son bastante inactivas. Sin embargo, cuando un vaso sanguíneo se rompe o resulta dañado, las plaquetas se exponen a diversos factores que instigan programas celulares interconectados y complicados que conducen a la coagulación sanguínea y a la formación de coágulos, lo cual que se revisa en Mechanisms of Platelet Activation y Control, K. S. Authl, S. P. Watson, y V. V. Kakar (eds.) Plenum Press, 1993. La activación de estos programas celulares da como resultado aumentos drásticos en las propiedades adhesivas de la membrana, la agregación plaquetaria, y la liberación de factores vasoconstrictores y fibrinolíticos. Como consecuencia, en el sitio del traumatismo se forma un coágulo, obstruyendo cualquier fisura en la pared del vaso y proporcionando un sustrato para la invasión de fibroblastos y la reparación.

[0004] Los primeros sucesos en el proceso de coagulación pueden separarse funcionalmente en dos componentes primarios: la adhesión y la activación. La adhesión es el proceso de "pegar" plaquetas en la pared vascular dañada, mientras que la activación inicia cambios fisiológicos complejos en el interior de la célula. En su conjunto, estos dos procedimientos dan como resultado la agregación plaquetaria, la formación de un tapón, y finalmente, un coágulo maduro. Aunque estos sucesos son cruciales, limitando la pérdida de sangre en el lugar donde se produce el daño, la adhesión y la activación plaquetaria también pueden contribuir a la agravación de una patología. Por ejemplo, la coagulación puede causar la obstrucción de vasos sanguíneos enfermos, lo que conduce a isquemia y puede producir daños en tejidos vitales tales como el corazón y el cerebro. La doble función de las plaquetas en la homeostasis y trombogénesis se revisa en Ruggeri, Nature Medicine, 8: 1227-1234 (2002).

[0005] La mayoría de las etapas en estos procesos depende de la interacción de ligandos extracelulares con receptores específicos integrados en la membrana celular de las plaquetas. *In vivo*, el primer cambio visible en el comportamiento de las plaquetas es la adhesión de estas a un área desnuda de endotelio que se produce por el daño endotelial. Entre los constituyentes micromoleculares que quedan expuestos al área desnuda de endotelio, se considera que el colágeno es el más reactivo con las plaquetas. El colágeno sustenta la adhesión plaquetaria mediante rutas directas e indirectas y también activa a las plaquetas iniciando la agregación plaquetaria y generando la actividad coagulante necesaria para la formación del tapón. Baumgartner, Thromb Haemost. 37: 1-16 (1977).

[0006] El contacto inicial entre las plaquetas y el subendotelio implica la interacción del complejo de glicoproteína GPIb-V-IX-plaqueta con el factor von Willebrand (vWf) unido al subendotelio expuesto. Esta interacción parece ser un proceso reversible y es insuficiente para una adhesión estable, como se ilustra mediante el "rodamiento" de las plaquetas a lo largo de la pared de los vasos. Ruggeri, Nature Medicine, 8: 1227-1234 (2002). Aunque la interacción con el vWf no inmoviliza completamente a las plaquetas circulantes, es esencial para la adherencia de las plaquetas en condiciones de flujo sanguíneo alto. La unión posterior irreversible de las plaquetas al colágeno subendotelial a través de la glucoproteína GPIa-IIa (conocida también como integrina $\alpha_2\beta_1$) estabiliza el suceso de interacción del vWf, anclando firmemente la plaqueta a la pared del vaso. A diferencia del vWf, la adhesión del colágeno parece ser un proceso más lento y solo es eficaz en condiciones de flujo bajo, o después de que las plaquetas se hayan detenido parcialmente por interacciones del vWf. Además, la unión de GPIa-IIa induce el aplastamiento (propagación) de las plaquetas contra la pared de los vasos. La propagación promueve la unión de otros factores de adhesión subendotelial incluyendo la fibronectina, la vitronectina y la trombospodina. Estas interacciones posteriores a la propagación también estabilizan la adhesión de las plaquetas a la pared de los vasos.

[0007] GPIa-IIa es una integrina que comprende una subunidad alfa y beta. En su conformación normal, las integrinas tienen baja afinidad por su ligando natural pero pueden convertirse en receptores de alta afinidad a través de señales generadas por otros receptores celulares Nieswandt B y Watson SP. Blood 102: 449-461 (2003). La estimulación de GPIa-IIa y otros receptores de colágeno induce una multitud de cambios fisiológicos. Entre estos se encuentran las

propiedades de adhesión de la superficie celular modificadas que da como resultado la agregación plaquetaria y la secreción de diversos compuestos bioactivos. Estos compuestos incluyen el vasoconstrictor, epinefrina, y factores de procoagulantes, que activan la trombina y conducen a la polimerización del fibrinógeno en las hebras de fibrina de un coágulo maduro. Además, las plaquetas activas liberan ADP y tromboxano A₂ (TXA₂). Estos poderosos factores trombogénicos amplifican la señal de activación inicial, reclutando plaquetas adicionales en el estado activado.

[0008] Además de GPIa-IIa, en la superficie celular de las plaquetas se expresan al menos dos receptores de colágeno distintos, concretamente, GPIV (CD36) y GPVI (revisado en Farndale RWetaL, J Thromb. Haemost 2: 561-573, 2004). Indicios de las funciones de estos receptores de colágeno plaquetarios proceden del estudio de variantes en pacientes humanos. Estudios de variantes en pacientes humanos sugieren que GPVI desempeña un papel principal en las interacciones plaqueta-colágeno mientras que la contribución de GPIV sigue siendo menor. Estos estudios también demostraron que un número sustancial de individuos que carecían de GPIa-IIa o GPVI presentaban tiempos de sangrado ligeramente prolongados en comparación con los que expresaban GPIa-GPIIa o GPVI. Además, generalmente las carencias de GPIa-IIa conducen a trastornos de sangrado más graves que las carencias de GPVI. Sin embargo, estos pacientes casi nunca presentan tendencia a sangrado grave, tal como el observado en individuos con el Síndrome de Bernard Soulier, producido por una carencia de GPIb, o con tromboastenia de Glanzmann, producida por una carencia de GPIIb-IIIa.

[0009] Las observaciones de variantes humanas, junto con recientes datos *in vitro*, sugieren que los tres receptores de colágeno actúan conjuntamente para mediar las interacciones colágeno-plaqueta. Actualmente es posible, por ejemplo, bloquear *in vitro* la actividad de cada receptor de colágeno con anticuerpos específicos para los sitios receptores del colágeno. Individualmente, cada anticuerpo inhibe parcialmente la adhesión de las plaquetas al colágeno y las combinaciones de anticuerpos por parejas son significativamente más inhibitorias, particularmente cuando GPIa-IIa y GPVI se inhiben simultáneamente. Además, estos estudios demuestran que GPIV, GPIa-IIa y GPVI contribuyen a la trombosis a través de dos rutas distintas, mecanísticamente distinguibles por la necesidad de cationes metálicos divalentes.

[0010] La información bioquímica y de secuencias indica que GPIa-IIa es un receptor de tipo integrina dependiente de cationes. En cambio, estudios bioquímicos revelan que GPIV y GPVI no necesitan cationes metálicos bivalentes y son, por tanto, de tipo no-integrina. De las clases de no integrina, observaciones de sujetos humanos sugieren claramente que GPVI es más importante que GPIV en el proceso de adhesión primario. De hecho, experimentos *in vitro*, en los que la función de GPIa-IIa se bloquea por quelación de los cationes bivalentes, anticuerpos dirigidos contra GPVI anulan completamente la interacción colágeno-plaqueta. Nakamura et al. J. Biol. Chem. 273: 4338-4344, (1998).

[0011] GPVI se identificó por primera vez hace aproximadamente 30 años por isoelectroenfoque y electroforesis. Hasta hace poco, su función no estaba completamente definida y se conocía simplemente como una glicoproteína plaquetaria con una masa molecular de aproximadamente 62 kDa en condiciones reductoras. Sin embargo, aproximadamente a principios de 1987, el Dr. Minoru Okuma y colegas examinaron a diversos pacientes con una forma de púrpura trombocitopénica, un síndrome de sangrado/contusión caracterizado por una destrucción plaquetaria acelerada y un número de plaquetas circulantes disminuido. En algunos pacientes del doctor Okuma las plaquetas se agregaron normalmente en respuesta a la mayoría de agonistas, incluyendo ADP, trombina, ristocetina e ionoforo de calcio (A23187) pero fueron notablemente insensibles a colágeno. Además, se observó que estas plaquetas tenían cantidades reducidas, o incluso carecían totalmente, de la glucoproteína de 62 kDa. Sugiyama et al., Blood 69: 1712-20 (1987); Moroi et al., J. Clin. Invest. 84: 1440-45 (1989); Ryo et al., Am. J. Hematol. 39: 25-31 (1992); y Arai et al., Brit. J. Haematol. 89: 124-130 (1995).

[0012] El reactivo clave en los primeros estudios de la función de GPVI procede de uno de los pacientes con púrpura trombocitopénica del doctor Okuma. Este paciente presentó sangrado masivo, inexplicable y se trató por transfusión con plaquetas acopladas a HLA (por las siglas en inglés de Antígenos Leucocitarios Humanos). Un examen detallado posterior de la sangre del paciente reveló una carencia total de GPVI. Más sorprendentemente, como esta paciente carecía totalmente de GPVI, su sistema inmunitario había identificado a las moléculas de GPVI en las plaquetas transfundidas como antígenos extraños y produjo anticuerpos policlonales contra GPVI. Sugiyama et al., Blood 69: 1712-20 (1987).

[0013] Un anticuerpo de origen natural consta de dos sitios de unión idénticos, específicos para un solo epítipo antigénico. Las dos partes específicas de antígeno están conectadas por un tronco común, o dominio Fc, para formar un complejo capaz de unirse a dos moléculas de antígeno idénticas. Además, la naturaleza divalente del anticuerpo, junto con las propiedades agregatorias del dominio Fc, permite el entrecruzamiento y la agregación de muchas moléculas antigénicas específicas. El doctor Okuma descubrió que los anticuerpos divalentes del suero de la paciente causaba una respuesta de agregación masiva cuando se mezclaban con plaquetas normales. Por el contrario, cuando los dominios específicos de antígeno se volvían monovalentes por retirada enzimática del dominio de unión Fc, los fragmentos Fab resultantes anulaban completamente la agregación de plaquetas normales inducida por colágeno e inhibían la adhesión del colágeno a las plaquetas.

- 5 **[0014]** El doctor Okuma ha preparado gentilmente este extraño suero disponible para la comunidad científica. Desgraciadamente, el suministro es limitado y las circunstancias que rodean a este descubrimiento son prácticamente irreproducibles. Aunque el suero de Okuma hizo posible gran parte de la investigación dentro de la función de GPVI y durante mucho tiempo había proporcionado el único método para identificar una proteína como GPVI, recientemente se ha descubierto que la lectina de tipo C, la convulxina, se une específicamente a GPVI con alta afinidad y puede marcarse como una sonda para identificar la proteína GPVI. Francishetti et al., *Toxicon* 35: 1217-28 (1997); Polgaretal., *J. Biol. Chem.* 272(24): 13576-83 (1997); Jandrot-Perrus et al., *J. Biol. Chem.* 272(2): 27035-41 (1997). La convulxina es un componente venenoso de la serpiente cascabel tropical *Crotalus durissus terrificus*. En su forma nativa, divalente, la convulxina es un fuerte inductor de la agregación plaquetaria y de la secreción de factores proagregatorios y procoagulantes. La naturaleza divalente de la convulxina es crítica para el efecto de agregatorio. Aunque la fisiología subyacente de la reacción no está clara, subunidades individuales de convulxina aún se unen a GPVI, pero inhiben, en vez de inducir la agregación. Se ha sugerido que la convulxina monovalente bloquea la transmisión de señales inducidas por colágeno hacia el interior de la célula.
- 10
- 15 **[0015]** Incluso más recientemente, se determinó la secuencia completa de GPVI. Clemetson et al., *J. Biol. Chem.* 274: 29019-24 (1999); documento WO 00/68377; Jandrot-Perrus et al., *Blood* 96: 1798-807 (2000); Ezumietal., *Biochem Biophys Res Commun.* 277: 27-36 (2000). La GPVI pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y está asociada no-covalentemente con la cadena gamma del receptor Fc (cadena FcR γ). Gibbins et al., *FEBS Lett.* 413: 255-259 (1997); Tsuji et al., *J. Biol. Chem.* Actualmente se cree que la unión del colágeno a GPVI induce la fosforilación de tirosina de la FcR γ . Después, la FcR γ fosforilada atrae a la Syk quinasa, lo que conduce finalmente a una cascada de sucesos intracelulares que incluyen la fosfo-activación de Syk y fosfolipasa C- γ 2. Estos sucesos dan como resultado finalmente un aumento de los niveles de calcio intercelulares y la secreción de factores proagregatorios y procoagulantes. Por lo tanto, la cadena FcR γ sirve como la parte del receptor transductora de señales en plaquetas humanas y de ratón. Clemetson et al., *J. Biol. Chem.* 274: 29019-290 (1999); Jandrot-Perrus et al., *Blood* 96: 1798-1807 (2000); Gibbins et al., *FEBS Lett.* 413:255-259 (1997); Tsuji et al, *J. Biol. Chem.* 272:23528-23531 (1997).
- 20
- 25
- [0016]** Pacientes que carecen de GPVI padecen diátesis hemorrágica leve y sus plaquetas responden mal al colágeno. Sugiyama et al., *Blood* 69: 1712-1720 (1987); Moroi et al., *J. Clin. Invest.* 84: 1140-1445 (1989); Arai et al., *Br. J. Haemtol.* 89: 124-130 (1995). Estudios realizados con plaquetas humanas carentes de GPVI o plaquetas bloqueadas con fragmentos Fab anti-GPVI (obtenidas de suero de un paciente) demostraron claramente una ausencia de interacción plaquetaria con colágeno inmovilizado a baja y alta velocidad de cizalla y adhesión firme reducida para inmovilizar vWf a cizalla alta. Goto et al., *Circulation* 106: 266-272 (2002).
- 30
- [0017]** Estudios realizados con ratones genosuprimidos (*knockout*) carentes de cadena FcR γ , que también dan como resultado un fenotipo carente de GPVI, o con ratones con poca GPVI, confirmaron estas observaciones, pero estos animales presentaron un tiempo de sangrado en la cola ligeramente prolongado. Nieswandt et al., *The EMBO Journal* 20: 2120-2130 (2001). Ratones carentes de GPVI, positivos a FcR γ , mostraron tiempos de sangrado similares a los de los ratones de tipo silvestre y heterocigotos para GPVI. Las plaquetas de los ratones carentes de en GPVI no se agregaron en respuesta al colágeno y a la convulxina y mostraron adhesión drásticamente reducida al colágeno inmovilizado en condiciones de flujo, confirmando por lo tanto que la GPVI desempeña una función principal en las funciones plaquetarias inducidas por colágeno y en la trombosis. Kato et al., *Blood* 102: 1701-1707 (2003).
- 35
- 40
- [0018]** Actualmente se acepta que la GPVI es el receptor fundamental para la activación plaquetaria inducida por colágeno y es un conducto crítico para la transducción de señal. Ichinohe et al, *J. Biol Chem.* 270(47): 28029-28036 (1995); Tsuji et al., *J. Biol Chem.* 272(28): 23528-31 (1997). En cambio, el otro receptor de colágeno principal en plaquetas, GPIa-IIa, está principalmente implicado con los procesos dependientes de cationes para efectuar la adhesión y propagación estable lo que conduce al desarrollo del trombo. Revítese en Nieswandt y Watson, *Blood* 102: 449-461 (2003).
- 45
- [0019]** La necesidad en la técnica de antagonistas de GPVI, tales como anticuerpos contra GPVI, se destaca por el hecho lamentable de que la agregación plaquetaria inapropiada y la formación de coágulos es un factor etiológico principal en una amplia diversidad de enfermedades humanas, más comúnmente enfermedades vasculares. La deposición excesiva de plaquetas en las paredes internas de las arterias y venas contribuye al desarrollo de la aterosclerosis y placas arterioscleróticas, que reducen el flujo de la sangre hacia tejidos sensibles. Finalmente, esta acumulación dependiente de plaquetas puede manifestarse como infarto de miocardio agudo, angina crónica inestable, isquemia transitoria, ictus, enfermedad vascular periférica, trombosis arterial, embolismo pulmonar, reestenosis y diversas otras afecciones.
- 50
- 55
- [0020]** Estas afecciones comienzan típicamente con un coágulo anómalo, denominado trombo, que se desarrolla en un vaso sanguíneo. Una vez desarrollado el coágulo, el flujo de sangre continuo a lo largo del coágulo es probablemente lo que lo libera de su adhesión. Dichos coágulos que fluyen libremente se conocen como émbolos. Los émbolos generalmente se desplazan a través de la circulación hasta quedar atrapados en un punto estrecho en el sistema circulatorio. Esta oclusión puede suceder en las arterias cerebrales, pulmonares o coronarias, dando como resultado dolor, discapacidad o muerte.
- 60

[0021] Los coágulos intravasculares pueden ser el resultado de esclerosis de origen natural, choque septicémico o daño físico a los vasos sanguíneos. De hecho, los métodos muy invasivos usados para diagnosticar y tratar enfermedades vasculares (por ejemplo injertos vasculares, catéteres exploratorios y permanentes, endoprótesis, derivaciones y otros dispositivos) en sí mismos, dañan las paredes de los vasos. Esto puede activar a las plaquetas, estimular la agregación y finalmente conducir a la formación de trombos y émbolos, poniendo en peligro adicionalmente la vida y la salud del paciente. Por tanto, los métodos para controlar o reducir la agregación plaquetaria y la formación de coágulos han sido un objetivo buscado durante mucho tiempo para el tratamiento de estas enfermedades.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

[0022] La presente invención proporciona anticuerpos específicos contra GPVI que son inhibidores más potentes de las funciones plaquetarias inducidas por colágeno que los descritos previamente en la técnica. Por tanto, los anticuerpos específicos de la invención específicos contra GPVI pueden ser agentes antitrombóticos útiles y pueden tener efectos secundarios reducidos a menudo asociados con la administración de otros agentes antitrombóticos.

[0023] En el presente documento se describe un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, que inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno a un valor CI_{50} de menos de aproximadamente 7, 4, 3, 2, 1, 0,6, $\mu\text{g/ml}$ o cualquier valor incluido dentro este intervalo. El anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, también puede inhibir la adhesión plaquetaria inducida por colágeno a un valor CI_{50} de menos de aproximadamente 1, 0,5, 0,2, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o cualquier valor incluido dentro de este intervalo.

[0024] En el presente documento también se describe un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, que se une específicamente a un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, a una K_d igual a o menor que 10^{-8} M. Los anticuerpos anti-GPVI descritos en el presente documento también pueden unirse específicamente a un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, a una K_d igual a o menor que 10^{-9} M.

[0025] Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento también inhiben la secreción de ATP inducida por colágeno y/o la formación de tromboxano A_2 inducida por colágeno. Los anticuerpos monoclonales incluyen fragmentos de anticuerpo activos. Los fragmentos de anticuerpo activos pueden incluir fragmentos Fab producidos química, enzimáticamente o de manera recombinante, fragmentos $F(ab)_2$, o péptidos que comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) específica para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI. En una realización de la invención, las CDR comprenden cualquiera de las secuencias de las SEC ID N°: 1-24, o una variante de las mismas, en la que la variante de la CDR se une específicamente a un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI. Los anticuerpos ejemplares incluyen OM1, OM2, OM3 y OM4.

[0026] En el presente documento también se describe un uso para inhibir la agregación plaquetaria, la secreción de ATP inducida por colágeno, la formación de tromboxano A_2 inducida por colágeno y/o la adhesión plaquetaria, poniendo en contacto plaquetas con un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI.

[0027] En el presente documento también se describe un método para producir un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI. El método comprende inmunizar a un huésped carente de GPVI con un antígeno GPVI y obtener el anticuerpo. Un huésped carente de GPVI incluye, por ejemplo, un huésped heterocigoto para GPVI y un huésped genosuprimido para GPVI homocigoto. También se describen anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, producidos por el método descrito.

[0028] La invención también proporciona una composición antitrombótica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal de la invención específico contra GPVI. El agente antitrombótico puede usarse para tratar a un paciente. Por tanto, un aspecto de la invención proporciona un método para tratar a un paciente que necesita, por ejemplo, tratamiento para una enfermedad vascular.

[0029] Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para identificar agentes antitrombóticos poniendo en contacto un antígeno GPVI con un anticuerpo monoclonal de la invención específico contra GPVI y un compuesto de ensayo y medir la inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal con el antígeno GPVI. El antígeno GPVI, el anticuerpo monoclonal específico contra GPVI y el compuesto de ensayo pueden añadirse en cualquier orden. Por ejemplo, el antígeno GPVI puede ponerse en contacto con el compuesto de ensayo antes de ponerse en contacto con el anticuerpo monoclonal específico contra GPVI. En otro ejemplo, el antígeno GPVI puede ponerse en contacto con el anticuerpo monoclonal específico contra GPVI y el compuesto de ensayo simultáneamente.

[0030] Debe entenderse que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son solo ejemplares y explicativas y que, como se reivindica, no limitan la invención.

[0031] Los dibujos adjuntos, que se incorporan en, y que constituyen una parte de, la presente memoria descriptiva, ilustran diversas realizaciones de la invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0032] La Figura 1 es un diagrama esquemático de la generación de ratones genosuprimidos para GPVI. La Figura 1A muestra el alelo de tipo silvestre de GPVI, el vector diana usado para la recombinación homóloga en los exones 2 y 3 y el alelo mutante resultante. La Figura 1 demuestra las diferencias de tamaño de los fragmentos 5' y 3' derivados por escisión con enzimas de restricción en genomas de tipo silvestre y mutante.

10

[0033] La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra los efectos de los fragmentos Fab de OM1, OM2, OM3 y OM4 a 0,1-100 µg/ml sobre la adhesión plaquetaria (humana) a colágeno fibrilar en condiciones estáticas.

15

[0034] La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra los efectos de los fragmentos Fab de OM1, OM2, OM3 y OM4 a 0,001-1 µg/ml sobre la adhesión plaquetaria humana independiente de Mg²⁺ (dependiente de GPVI) a colágeno fibrilar en condiciones estáticas.

20

[0035] La Figura 4 ilustra los efectos de los fragmentos Fab de OM1, OM2, OM3 y OM4 y ReoPro[®] sobre la adhesión plaquetaria (humana) a colágeno insoluble en ácido condiciones de tensión de cizalla alta (2600 s⁻¹).

[0036] La Figura 5 es una transferencia de Western de los anticuerpos de la serie OM (OM1, OM2, OM3 y OM4) y convulxina (CVX) que reaccionan con GPVI en un lisado de plaquetas humanas.

25

[0037] La Figura 6 ilustra la ausencia completa de agregación plaquetaria inducida por colágeno y convulxina en animales genosuprimidos para GPVI.

[0038] La Figura 7 ilustra la ausencia de interacción de plaquetas de ratones genosuprimidos para GPVI con colágeno insoluble en ácido condiciones de tensión de cizalla alta.

30

[0039] La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto del fragmento Fab de OM2 y ReoPro[®] sobre la agregación plaquetaria *ex vivo* inducida por colágeno en monos *Cynomolgus*.

[0040] La Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto del fragmento Fab de OM2 y ReoPro[®] sobre el tiempo de sangrado cutáneo en monos *Cynomolgus*.

35

[0041] La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto anti-agregación del fragmento Fab de OM2 y ReoPro[®] a lo largo del tiempo después de inyección embolada (0,4 mg/kg) en monos *Cynomolgus*.

[0042] La Figura 11 es un gráfico que muestra el efecto cinético del fragmento Fab de OM2 y ReoPro[®] sobre el tiempo de sangrado cutáneo después de inyección embolada (0,4 mg/kg) en monos *Cynomolgus*.

40

[0043] La Figura 12 ilustra los efectos de los fragmentos Fab de OM4 y F(ab')₂ de 7E3 sobre la agregación plaquetaria *ex vivo* en ratas inducida por colágeno.

45

[0044] La Figura 13 ilustra los efectos de los fragmentos Fab de OM4 y F(ab')₂ de 7E3 sobre el tiempo de sangrado en ratas. La Figura 13A muestra los efectos sobre el tiempo de sangrado en las uñas y la Figura 13B muestra los efectos sobre el tiempo de sangrado en la cola.

[0045] La Figura 14 ilustra los efectos de los fragmentos Fab de OM4 y F(ab')₂ de 7E3 sobre el recuento plaquetario en ratas.

50

[0046] La Figura 15 es un gráfico de barras que muestra el efecto del fragmento Fab de OM4 sobre la formación de un trombo arterial en ratas cuando se administra antes (Figura 15A) y después (Figura 15B) de un daño endotelial.

55

[0047] La Figura 16 es un gráfico que muestra la unión *in vitro* dependiente de la concentración del fragmento Fab de OM2 biotinilado a plaquetas humanas.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

[0048] La presente invención describe nuevos anticuerpos específicos contra GPVI que son fuertes inhibidores de respuestas plaquetarias inducidas por colágeno, incluyendo, pero sin limitación, agregación, adhesión plaquetaria, liberación de ATP inducida por colágeno y formación de tromboxano A₂ (TXA₂). En el presente documento también se describen métodos para producir los anticuerpos anti-GPVI. Los anticuerpos anti-GPVI de la invención pueden ser útiles para inhibir la formación de trombos y para el tratamiento de pacientes que necesitan tratamiento antitrombótico.

[0049] El término "anticuerpos" incluye anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen fragmentos de anticuerpo activos, tales como, fragmentos F(ab')₂ y Fab, así como cualquiera de los compañeros de unión producidos de manera recombinante. Se define que los anticuerpos se "unen específicamente" si se unen a un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, con una constante de disociación (Kd) igual a o menor que 10⁻⁷ M. En una realización de la invención los anticuerpos anti-GPVI se unen específicamente a un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, con una Kd igual a o menor que 10⁻⁸ M. En otra realización los anticuerpos anti-GPVI de la invención se unen específicamente a un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, a una Kd igual a o menor que 10⁻⁹ M. Las afinidades de los compañeros de unión o de los anticuerpos puede determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, midiendo, por ejemplo, la saturación de isotermas de unión de IgG, o sus fragmentos, marcados con ¹²⁵I, o por desplazamiento homólogo de ¹²⁵IgG por IgG no marcada usando análisis de regresión no lineal como describe Motulsky, en *Analyzing Data with GraphPad Prism* (1999), GraphPad Software Inc., San Diego, CA. En la materia se conocen otras técnicas, por ejemplo, las descritas por Scatchard et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 51:660 (1949). En la Publicación de Estados Unidos N° 2003/0186885 se describen polipéptidos, péptidos, o sus variantes de origen natural, de GPVI.

[0050] Los anticuerpos pueden generarse fácilmente a partir de una diversidad de fuentes, por ejemplo, caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones, hámsteres o ratas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los animales hospedadores pueden ser hámsteres armenios. Los animales hospedadores también pueden ser animales carentes de GPVI. Como se usa en el presente documento, "carente de GPVI" se refiere a una reducción de aproximadamente el 50% o mayor en la producción de GPVI endógena en un animal en comparación con un animal de tipo silvestre. La reducción en la producción de GPVI endógena puede ser tal que la producción de GPVI esté completamente inhibida. Los animales carentes de GPVI pueden generarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos pueden incluir la manipulación de la producción de GPVI a nivel de ácido nucleico (ADN o ARN) en un animal. Los animales carentes de GPVI pueden generarse mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, genosupresión (véase, por ejemplo Galli-Taliadoros et al., *J. Immunol. Methods* 181: 1-15,1995; Robbins, *Circ. Res.* 73:3-9,1993; Hergueux et al., *Transplant Proc.* 25: 30-32,1993), genosustitución (Colucci-Guyon et al., *Cell* 79: 679-694,1994; Le Mouellic et al., *PNAS* 87: 4712-4716,1990; Hanks et al., *Science* 269: 679-682, 1995; Wang et al., *Nature* 379: 823-825,1996), mutación (Askew et al., *Mol. Cell. Biol.* 13: 4115-4124,1993; Stacey et al., *Mol. Cell. Biol.* 14: 1009-1016,1995; Hasty et al., *Nature* 350: 243-246,1991; Valancius et al., *Mol. Cell. Biol.* 11: 1402-1408,1991; Wu et al., *PNAS* 91: 2819-2823,1994; Horie et al., *Gene* 166: 197-204,1995; Toth et al., *Gene* 178: 161-168,1996), delección (You et al., *Nature Genet.*, 15: 285-288,1997; Holdener-Kenny et al., *Bioessays* 14:831-839,1992), tecnología de oligonucleótidos antisentido (Wagner et al., *Nature Biotechnol.* 14: 840-844,1996; Kitajima et al., *Science* 258: 1792-1795,1992; Urban et al., *Farmacol.* 58: 243-58, 2003; Orum et al., *Curr Opin Mol Ther.* 3: 239-43, 2001; Sohail et al., *Curr Opin Mol Ther.* 2: 264-71, 2000; Smith et al., *Eur J Pharm Sci.* 11: 191-8, 2000), tecnología de ARN de interferencia (ARNi) (Scherr et al., *Curr Med Chem.* 10: 245-56,2003; Nishikura, *Cell* 107: 415-418, 2001; Hannon, *Nature* 4418: 244-251, 2002; Patente de Estados Unidos N° 5.506.559), o usando cualquier otro producto químico, de origen natural, recombinante o péptidos sintéticos, polipéptidos, proteínas, polisacáridos, pequeñas moléculas y otros compuestos diseñados para reducir o inhibir la producción de GPVI en un hospedador.

[0051] Sin ceñirse a la teoría, los hospedadores que no producen ninguna o que producen cantidades menores de las normales de GPVI endógena pueden crear una reacción inmunitaria más fuerte contra GPVI que los que fabrican niveles normales de GPVI. Por tanto, pueden producirse anticuerpos contra GPVI que sean más eficaces inhibiendo las respuestas de las plaquetas inducidas por colágeno, tales como agregación plaquetaria, trombogénesis y/o activación plaquetaria a dosis más bajas en comparación con los obtenidos a partir de hospedadores normales que fabrican GPVI. En Pass et al., *Scand. J. Immunol.* 58: 298-305 (2003); Zlotetal., *J. Lipid Res.* 40: 76-84 (1999); Declerck et al., *J. Biol. Chem.* 270: 8397-8400 (1995); y Castrop et al., *Immunobiology* 193: 281-287 (1995) se han descrito métodos para producir anticuerpos en animales genosuprimidos.

[0052] Los hospedadores pueden inmunizarse como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003/0186885 A1. Brevemente, los hospedadores pueden inmunizarse con "antígeno GPVI" que incluye, pero sin limitación, polipéptidos, péptidos, o sus variantes de origen natural, de GPVI nativos, aislados de plaquetas u de otras células que expresan GPVI, polipéptidos, péptidos de GPVI recombinante o formas recombinantes de sus variantes de origen natural, expresadas de células eucariotas y procariotas; plaquetas obtenidas de diversas especies, incluyendo seres humanos; células que expresan polipéptidos, péptidos, o sus variantes de origen natural, de GPVI; ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, péptidos o sus variantes de origen natural, de GPVI y/o cualquier combinación de los mismos.

[0053] Los polipéptidos de GPVI purificados, o un péptido basado en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos GPVI conjugados con un adyuvante o transportador se administran típicamente al animal hospedador por vía intraperitoneal. La inmunogenicidad de los polipéptidos de GPVI puede potenciarse mediante el uso de un adyuvante, por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund. Después de inmunizaciones de refuerzo, se recogen pequeñas muestras de suero y se someten a ensayo para determinar la reactividad contra los polipéptidos de GPVI. Los ejemplos de diversos ensayos útiles para tal determinación incluyen los descritos en: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; así como procedimientos tales como

inmunolectroforesis por contracorriente (CIEP), radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación (RIP), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos de transferencia puntual y ensayos de tipo sándwich y FACS. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.376.110 y 4.486.530.

5 **[0054]** Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse fácilmente usando procedimientos bien conocidos, véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en las Patentes de Estados Unidos N° RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439 y 4.411.993; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn y Bechtol (eds.), 1980. Brevemente, a los animales hospedadores se les inyecta por vía intraperitoneal, a intervalos de aproximadamente una semana, un antígeno GPVI, opcionalmente en presencia de adyuvante. Las inmunizaciones se realizan hasta conseguir el título de anticuerpo deseado.

15 **[0055]** Después, los sueros de ratón se someten a ensayo para determinar el título de anticuerpos por análisis FACS usando células CHO transfectadas con la cadena FcR γ de GPVI, o cualquier otro método conocido en la técnica. A los ratones seleccionados se les proporciona una dosis de refuerzo del antígeno GPVI. Tres días después, los ratones se sacrifican y sus esplenocitos se fusionan con células de mieloma disponibles en el mercado, P3U1 (ATCC), siguiendo protocolos establecidos. Las células de mieloma se lavan varias veces en medio asérico y se fusionan a esplenocitos de ratón. El agente de fusión es PEG al 50% (Roche). La fusión se siembra en 8 placas de fondo plano de 96 pocillos (Corning) que contiene medio DMEM complementado con HAT y se deja crecer durante 1-2 semanas. Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes se recogen y se analizan para determinar la presencia de anticuerpos anti-GPVI realizando análisis FACS usando células CHO que expresan GPVI y la cadena FcR γ . También se realiza análisis FACS usando células CHO de tipo silvestre para eliminar clones que producen anticuerpos contra antígenos de células CHO. Los clones positivos pueden crecer en cultivo a granel y los sobrenadantes se purifican posteriormente sobre una columna Sheparose con proteína A o G (Pharmacia). Se entiende que, para generar anticuerpos contra los polipéptidos y péptidos de GPVI, podrían usarse muchas técnicas y que esta realización de ninguna manera limita el alcance de la invención.

25 **[0056]** Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden producirse usando técnicas alternativas, tales como las descritas por Alting-Mees et al., *Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas*, en *Strategies in Molecular Biology* 3: 1-9 (1990). De manera similar, los compañeros de unión construidos, por ejemplo, usando técnicas de ADN recombinante para incorporar las regiones variables de un gen que codifican un anticuerpo de unión específico, se incluyen en los anticuerpos monoclonales de la invención. Tal técnica se describe en Larrick et al., *Biotechnology*, 7: 394 (1989).

35 **[0057]** Junto con el conocimiento en la situación de la técnica pueden producirse otros tipos de anticuerpos. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos antiidiotipo inmunizando a un hospedador con un antígeno que comprenda el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-GPVI monoclonal purificado y someter a ensayo los sueros resultantes o el sobrenadante monoclonal para determinar actividad como se describe en Knight et al., *Mol. Immunol* 32: 1271-81 (1995). Los anticuerpos antiidiotípicos pueden obtenerse inmunizando a un hospedador con un péptido que comprenda una región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-GPVI de la invención. Los anticuerpos antiidiotípicos incluyen fragmentos de anticuerpos antiidiotípicos activos, que se refieren a fragmentos de un anticuerpo antiidiotípico producidos química, enzimáticamente o de manera recombinante, que incluyen, Fab, F(ab) $_2$, o péptidos que comprendan al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un anticuerpo anti-GPVI. Además, en el presente documento también se describen sitios de unión de anticuerpos GPVI biosintéticos, como describen Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879 (1988); los anticuerpos de un solo dominio que comprenden dominios variables de cadena pesada aislados, como describen Ward et al., *Nature* 341: 544 (1989); y anticuerpos que se han modificado por ingeniería genética para contener elementos de anticuerpos humanos que sean capaces de unirse específicamente a polipéptidos de GPVI. Los anticuerpos anti-GPVI también pueden generarse usando la tecnología de presentación de fagos, como describen Ventor et al, *Ann Rev. Immunol.* 12: 43355 (1994) y las referencias citadas en su interior.

50 **[0058]** En el presente documento también se describen fragmentos de anticuerpos activos, que se refieren a fragmentos de un anticuerpo producidos química, enzimáticamente o de manera recombinante, que incluyen, Fab, F(ab) $_2$, o péptidos que comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un polipéptido, un péptido, o a una de sus variantes de origen natural, de GPVI. Un método enzimático común que utiliza pepsina o papaína elimina el dominio de anticuerpo Fc para producir fragmentos Fab bivalentes F(ab) $_2$ y monovalentes. Estos procedimientos se describen básicamente en Gorini et al., *J. Immunol.* 103: 1132 (1969); *Handbook of Experimental Immunology Vol 1: DM Wier (ed)*, Blackwell Alden Press, Oxford, UK, 1997; y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; y en la Patente de Estados Unidos N° 4.470.925 (Auditore-Hargreaves).

60 **[0059]** Los anticuerpos específicos de GPVI intactos y fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab) $_2$, pueden acoplarse covalentemente a fármacos o a moléculas transportadoras. Además, los anticuerpos específicos contra GPVI pueden entrecruzarse, directamente, o a través de una molécula transportadora adecuada,

para formar complejos multivalentes. Los fragmentos F(ab)₂ pueden estabilizarse metabólicamente por entrecruzamientos covalentes, como se describe en Reno et al. (Patente de Estados Unidos N°: 5.506.342),

5 [0060] Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido, péptido o una de sus variantes de origen natural, de GPVI pueden someterse a ensayo para determinar su capacidad para bloquear la activación plaquetaria por unión dependiente del ligando (colágeno). Los anticuerpos monoclonales que bloquean funciones plaquetarias pueden ser agentes antitrombóticos útiles.

10 [0061] Los anticuerpos de la presente invención también pueden humanizarse. Los anticuerpos humanos y humanizados se prefieren por tanto para el uso clínico. Véanse, por ejemplo, LoBuglio et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4220-24 (1989); Meredith et al., J. Nud. Med. 33, 23-29 (1992); Salah et al., Hum. Antibod. Hybridomas 3: 19-24(1992); Knight et al., Mol. Immunol 32: 1271-81 (1995); y Lockwood et al., Q. J. Med. 89: 903-12, (1996).

15 [0062] El desarrollo de anticuerpos completamente humanos generalmente requiere una fuente adecuada de linfocitos B inmunitarios humanos. Un método para generar anticuerpos humanos implica la inmunización y expansión de linfocitos B con especificidades adecuadas a partir de grupos de células B vírgenes, obtenidas de individuos no inmunizados, que se pusieron en cultivo *in vitro*. Ohlin y Borrebaeck, en Methods of Immunological Analysis, vol. II, Masseyeff et al. (eds), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, págs. 298-325 (1992); Borrebaeck y Ohlin, en Protocols in Cell and Tissue Culture, Doyle et al. (eds), J. Wiley & Sons Ltd., Chichester 25E: 1.1-7 (1993). Mediante este método se han desarrollado anticuerpos humanos contra glicoproteínas del VIH-1. Ohlin et al., Immunology 68: 20 325-331 (1989); Ohlin et al., Clin. Exp. Immunol. 89: 290-295 (1992); Duenas et al., Immunology 89: 1-7 (1996). Más recientemente, se han desarrollado tecnologías *in vivo* que utilizan animales injertados con células inmunitarias humanas o aquellos en los que se han introducido loci completos de inmunoglobulinas humanas. Ilan et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 4: 102-109 (2002); Ishida et al., Cloning Stem Cells 4: 91-102 (2002). Los anticuerpos completamente 25 humanos se han producido después de inmunización de estos animales con diversos antígenos humanos.

[0063] Los anticuerpos humanizados pueden generarse reemplazando la mayoría de, o todas, las partes estructurales de un anticuerpo monoclonal con secuencias de anticuerpo humanas correspondientes. Por consiguiente, se genera una molécula híbrida en la que solo la variable específica de antígeno, o la región determinante de la 30 complementariedad (CDR) está compuesta de secuencias no humanas. En Winter y Milsteh, Nature 349: 293-99 (1991); Harris, BCSTBS5 23(4): 1035-38 (1995); Morrison y Schiom, en Important Advances in Oncology, J. B. Lippincott Co. (1990); L. Presta, "Humanized Monoclonal Antibodies," en Annual Reports In Medicinal Chemistry, Academic Press, (1994); y A. Lewis y J. Crowe, "Generation of Humanized Monoclonal Antibodies by 'Best Fit' Framework Selection and Recombinant Polymerase Chain Reaction" in Generation of Antibodies by Cell and Gene 35 Immortalization. Year Immunol. 1993, vol 7, páginas 110-118, (C. Terhorst, F. Malvasi, and A. Albertini (eds.) Basel, Karger, se han revisado diversas estrategias para diseñar anticuerpos humanizados.

[0064] Los anticuerpos específicos para un polipéptido, péptido o sus variantes de origen natural, de GPVI, también puede humanizarse seleccionando y purificando anticuerpos anti-GPVI por adsorción específica de Ig, tal como por 40 cromatografía con Proteína A, o por cromatografía de afinidad usando péptidos de GPVI inmovilizados. Las cadenas pesada y ligera pueden disociarse por medios convencionales y purificarse las cadenas individuales. Puede determinarse una secuencia de aminoácidos parcial de las cadenas individuales y los oligonucleótidos degenerados pueden generarse para cada cadena de acuerdo con el método de Lathe et al., J. Mol. Biol. 183: 1-12 (1985). Después, el ADN que codifica estas cadenas de anticuerpo puede clonarse y secuenciarse a partir de la célula productora del 45 anticuerpo anti-GPVI por PCR u otros métodos convencionales.

[0065] El ADN del anticuerpo y la secuencia de aminoácidos pueden analizarse y comprobarse con secuencias conocidas de cadenas pesada y ligera humanas. Basándose en las comparaciones de secuencia, las cadenas de anticuerpo específicas de GPVI pueden humanizarse reemplazando partes del ADN no humano con secuencias 50 humanas, formando así un anticuerpo quimérico con especificidad contra GPVI. En una realización, el anticuerpo específico contra GPVI se humaniza con las regiones constantes J1 y K humanas usando los vectores de expresión descritos por Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218 (1987). En la técnica se conocen bien métodos para la preparación de híbridos no humanos/humanos y se describen con detalle, por ejemplo, en Knight et al., Mol. Immunol 32: 1271-81 (1995); Patentes de Estados Unidos N°: 5.705.154 (Dalie et al.); 5.693.322 (Creekmore et al.); 5.677.180 (Robinson et al.); 5.646.253 (Wallace et al.); 5.585.097 (Bolt et al.); 5.631.349 (Diamantstein et al.); y 5.580.774 (Beavers et al.) Para maximizar la producción de anticuerpos quiméricos con alta afinidad, pueden emplearse los 55 métodos de Queen et al., (Patente de Estados Unidos N° 5.585.089) y Queen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 10029-33 (1989).

60 [0066] También pueden generarse anticuerpos humanizados usando la estrategia de presentación de fagos, como explican Rader et al., en Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 95: 8910-8915 (1998) y Steinberger et al., J. Biol. Chem. 275: 36073-36078 (2000) e ilustran Son et al., J Immunol Methods. 286: 187-201 (2004), Lee et al., J Immunother. 27: 201-210 (2004) y otros expertos en la materia.

[0067] La parte de la molécula de anticuerpo que se une a un antígeno comprende solo un pequeño número de aminoácidos en las regiones variable (V) de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL). Estos aminoácidos se ponen en estrecha proximidad por plegamiento de las regiones V. Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de IgG muestran que gran parte de la variabilidad reside en tres regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Cada cadena (H y L) contiene tres CDR. Los anticuerpos con diferentes especificidades tienen CDR diferentes, mientras que los anticuerpos de la misma especificidad exacta generalmente tienen CDR idénticas o muy conservadas. La presente invención incluye anticuerpos monoclonales o péptidos que comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR), o una de sus variantes, de los anticuerpos contra GPVI de la invención. La invención incluye anticuerpos monoclonales o péptidos que comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 1-24, o sus variantes.

[0068] Una "variante" de un anticuerpo o un péptido que comprende una CDR en su interior, se refiere a un anticuerpo o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a las SEC ID N°: 1-24, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la de las SEC ID N°: 1-24 debido a una o más deleciones, inserciones o sustituciones. La variante también conserva al menos el 70, 80, 90 o 100% de su afinidad de unión por un polipéptido, péptido o sus variantes de origen natural, de GPVI, en comparación con un anticuerpo o péptido que comprende su CDR correspondiente. Las afinidades de unión pueden determinarse de acuerdo con cualquier método conocido en la materia, como explican, por ejemplo, Fujimura et al., *Thromb. Haemost.* 87:728-734 (2002) y como se ilustra en el Ejemplo 4 más adelante. Una variante comprende una CDR que tiene preferentemente al menos una identidad del 60%, 65%, 70%, 80%, 85% o 90% con las SEC ID N°: 1-24. El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando el programa informático GAP, versión 6.0, descrito por Devereux et al. (*Nucl. Acids Res.* 12: 387, 1984) y disponible en la Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 443,1970), revisado por Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math* 2: 482,1981). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y de 0 para no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess (*Nucl. Acids Res.* 14: 6745,1986), como describen Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358,1979; (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para huecos finales.

[0069] Las variantes pueden comprender secuencias sustituidas de manera conservativa. La sustitución conservativa se refiere al reemplazo de un resto aminoacídico determinado con un resto que tiene características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala por otro o las sustituciones de un resto polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Se conocen bien otras de estas sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares.

[0070] Los anticuerpos anti-GPVI candidatos pueden someterse a exploración para determinar los efectos sobre la adhesión y activación de las plaquetas usando diversos ensayos conocidos en la materia. Estos incluyen, por ejemplo, el ensayo inhibitorio de adhesión plaquetaria, descrito en la Patente de Estados Unidos N°: 5.686.571; un ensayo de flujo constante modificado de Díaz-Ricart et al. (*Blood* 82: 491-496,1993) que permite el uso de un volumen más pequeño de sangre y menos anticuerpo, como describen Brown y Larson (*BMC Immunology* 2: 9-15, 2001); el ensayo en placa descrito por Matsuno et al. (*British J. Haematology* 92: 960-967,1996) y Nakamura et al. (*J. Biol. Chem.* 273(8): 4338-44,1998) (el "procedimiento de Nakamura"). En cada caso, los agonistas o antagonistas de GPVI candidatos pueden pre- o co-incubarse con los componentes de la reacción en presencia o ausencia de Mg^{2+} . La incubación en ausencia de Mg^{2+} bloquea la función de GPIa/IIa de tal manera que la actividad restante dependiente de colágeno está principalmente mediada por el receptor de GPVI.

[0071] Para medir, en condiciones estáticas, la adhesión plaquetaria con respecto al colágeno fibrilar insoluble en ácido inmovilizado puede usarse un procedimiento de Nakamura modificado. A continuación se describe el ensayo de Nakamura modificado. La modificación principal con respecto al ensayo original incluye el reemplazo de plaquetas marcadas con ^{51}Cr con plaquetas no marcadas y la medición de la adhesión por cuantificación de la actividad de la LDH liberada por las plaquetas adherentes usando un kit disponible en el mercado. Un experto en la materia reconoce cómo realizar otras modificaciones para las condiciones del ensayo considerando el anticuerpo anti-GPVI particular sometido a ensayo.

[0072] Ensayo de adhesión-- Los pocillos de microtitulación se recubrieron con colágeno fibrilar de tendón equino insoluble en ácido de tipo I. Se suspendieron plaquetas a una concentración de 4×10^9 en tampón Tyrode-HEPES o en tampón Tyrode-HEPES complementado con Mg^{2+} (1mM), y los ensayos de adhesión se realizaron como se ha descrito anteriormente (Tandon et al., *Br. J. Haematol.* 89: 124-30,1995). Resumiendo, antes de su adición a los pocillos recubiertos con colágeno, las plaquetas se incubaron con una muestra tal como una solución de anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente. La adhesión se realizó durante 60 minutos a temperatura ambiente en presencia y ausencia de Mg^{2+} . Las plaquetas no unidas se eliminaron por lavado repetido de los pocillos y las plaquetas adheridas

se disolvieron en Triton X-100. Para medir la actividad de la LDH liberada se usó un kit de medición de LDH disponible en el mercado (CytoTox 96, Promega, Madison, WI, USA) basado en un ensayo colorimétrico.

5 **[0073]** Ensayo de Liberación de ATP y generación de Tromboxano A₂ (TXA₂) -- La liberación de ATP inducida por colágeno se midió en un lumiagregómetro de doble canal (Modelo 650CA - Chronolog Corporation Havertown PA, USA). Resumiendo, se mezcló plasma rico en plaquetas (recuento de plaquetas ajustado a 3x10⁸/ml con plasma con pocas plaquetas) con reactivo luciferasa-luciferina (Chronolog Corporation). Las plaquetas se incubaron a 37 °C durante 5 minutos en presencia y ausencia de una solución de anticuerpo de ensayo, por ejemplo, fragmentos Fab, antes de exposición con colágeno. La agregación y liberación de ATP se midió simultáneamente. A tiempos deseados, la reacción se detuvo por adición de un cóctel de inhibidores que inhibían la síntesis de TXA₂. El sobrenadante de la suspensión plaquetaria se transfirió a un tubo pequeño y se congeló a -20 °C antes de medir la formación de TXA₂ inducido por colágeno. El TXA₂ se midió como TXB₂, un metabolito estable de TXA₂.

15 **[0074]** Ensayo de Agregación Plaquetaria --El ensayo de agregación plaquetaria descrito en Sun et al, J Cardiovascular Pharmacol. 40: 557-585 (2002) proporciona un ensayo sencillo para detectar o determinar la actividad antitrombótica. En un recipiente, que contenía plasma rico en plaquetas (200 µl), se añadieron anticuerpos anti-GPVI, por ejemplo, fragmentos intactos de IgG, F(ab')₂ o Fab o tampón de control (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4). Antes de inducir la agregación con colágeno, la mezcla se incubó durante 3 a 5 minutos a 37 °C en el módulo de calentamiento de un agregómetro. El recipiente se colocó en un agregómetro de cuatro canales. (AG10 Kowa, Japón), que medía la cinética de formación de partículas por dispersión láser y agregación por cambios en transmisión lumínica. La agregación se inició con 0,5-4 µg/ml de colágeno. Las concentraciones óptimas de colágeno son aquellas que proporcionan al menos un cambio del 70% en transmisión lumínica y se determinan para cada experimento. La agregación se controló durante al menos 8-10 minutos después de la adición de colágeno.

25 **[0075]** Ensayo *in vitro* -- Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, específicos contra GPVI pueden someterse adicionalmente a ensayo usando los sistemas desarrollados por Diaz-Ricart y colaboradores (Arteriosclerosis, Thromb. Veáse. Biol. 16: 883-888, 1996). Este ensayo determina el efecto de anticuerpos contra GPVI sobre plaquetas en condiciones de flujo usando aorta de conejo desendotelializada y matrices de células endoteliales.

30 **[0076]** Ensayo *in vivo* -- La actividad *in vivo* de los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, contra GPVI puede someterse a ensayo usando modelos de función plaquetaria convencionales, como se describe en Colter y Scudder, Blood 66: 1456-59 (1985); Colter et al, Blood 68: 783-86 (1986); Colter et al, Circulation 80: 1766-74 (1989); Colter et al., Ann. Intern. Med. 109: 635-38 (1988); Gold et al., Circulation 77, 670-77 (1988); y Mickelson et al., J. Molec. Cell Cardiol. 21: 393-405 (1989).

35 **[0077]** Los ensayos anteriores demuestran que los anticuerpos de la invención, específicos contra GPVI, son más fuertes que los previamente indicados por otros autores. Específicamente, los anticuerpos de la presente invención, específicos contra GPVI, inhiben la agregación plaquetaria inducida por colágeno a una CI₅₀ menor que la de los anticuerpos descritos en la técnica. El término "CI₅₀" se conoce en la técnica como la concentración a la cual se observa una inhibición del 50% y es cualquier valor positivo mayor de 0. Se determinó el valor de CI₅₀ para inducir la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno usando una concentración de colágeno que inducía una agregación plaquetaria del 70-90% a los 5 minutos de su contacto con las plaquetas. Los términos "inhibición" o "inhibir" se refieren a una disminución o cese de cualquier característica fenotípica o a la disminución o cese en cuanto a la frecuencia, grado o probabilidad de esa característica. En el contexto de agregación plaquetaria, "inhibición" se refiere a una disminución o cese medible en la agregación de las plaquetas. Tal inhibición puede detectarse mediante el ensayo descrito anteriormente o mediante cualquier otro método conocido en la técnica. De manera similar, en el contexto de adhesión plaquetaria, "inhibición" se refiere a una disminución o cese medible en cuanto a la adhesión de plaquetas sobre una superficie y tal inhibición puede detectarse mediante el ensayo descrito anteriormente o mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

50 **[0078]** Los anticuerpos específicos contra GPVI, descritos en el presente documento, inhiben la agregación plaquetaria inducida por colágeno a una CI₅₀ de menos de aproximadamente 7, 4, 3, 2,1, 0,6 µg/ml, o cualquier valor incluido dentro de este intervalo. Los anticuerpos específicos contra GPVI, descritos en el presente documento, también inhiben la adhesión plaquetaria inducida por colágeno a una CI₅₀ de menos de, o igual a, aproximadamente 1, 0,5, 0,2, 0,1 µg/ml, o cualquier valor incluido dentro de este intervalo. Los anticuerpos de la presente invención, específicos contra GPVI, también inhiben la secreción de ATP inducida por colágeno y/o la formación de tromboxano A₂ inducida por colágeno. Los anticuerpos de la presente invención, específicos contra GPVI, incluyen fragmentos de anticuerpos activos. Los fragmentos de anticuerpos activos incluyen fragmentos Fab, fragmentos F(ab)₂ y péptidos que comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) específicos para un polipéptido, péptido, o sus variantes de origen natural, de GPVI, producidos química, enzimáticamente o de manera recombinante.

60 **[0079]** Los anticuerpos de la presente invención, específicos contra GPVI, pueden formularse en composiciones farmacéuticas de acuerdo con métodos conocidos. La composición farmacéutica de la presente invención comprende al menos un anticuerpo específico contra GPVI e incluye anticuerpos monoclonales intactos. La composición farmacéutica

descrita en el presente documento también puede comprender fragmentos Fab; fragmentos F(ab)₂; y péptidos que comprenden al menos una secuencia CDR o sus variantes. Los anticuerpos específicos contra GPVI pueden combinarse con otros materiales conocidos activos.

5 **[0080]** Las composiciones de la presente invención incluyen al menos un anticuerpo específico contra GPVI mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo, pero sin limitación, diluyentes (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato, agua), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), emulsionantes, sales, polímeros, tampones, disolventes, adyuvantes y/o transportadores. En Remington: The Science and Practice of
10 Pharmacy, 20^a ed, Mack Publishing Co. (2000), se describen excipientes y sus formulaciones adecuadas. Además, tales composiciones pueden contener anticuerpos específicos contra GPVI formando complejos con polietilenglicol (PEG), iones metálicos, incorporados en compuestos poliméricos tales como ácido poliácético, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc. o incorporarse en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares, multilaminares o colaminares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos.

15 **[0081]** La presente invención también comprende usos para inhibir la trombosis, por ejemplo, inhibiendo la agregación o la adhesión plaquetaria, que comprende poner en contacto plaquetas activadas o inactivadas con anticuerpos dirigidos contra GPVI. La expresión "inhibir la trombosis" se refiere a una disminución o cese de un suceso trombótico o a la
20 disminución en la frecuencia, grado o probabilidad de sucesos trombóticos en un paciente, población de pacientes o sistemas de ensayo *in vitro*. La presente invención también se refiere al uso en el tratamiento de un paciente, definido en este documento como cualquier persona o animal no humano que necesita tratamiento anti-trombótico para reducir la frecuencia, probabilidad o grado de trombosis, o agregación plaquetaria, o activación plaquetaria, o a cualquier sujeto para el cual el tratamiento puede ser beneficioso para el tratamiento de enfermedades vasculares, incluyendo seres humanos y animales no humanos. Tales animales no humanos a tratar incluyen todos los vertebrados domesticados y no domesticados, incluyendo, pero sin limitación: ratones, ratas, conejos, peces, pájaros, hámsteres, perros, gatos, cerdos, ovejas, caballos, vacas y primates no humanos.

[0082] En el tratamiento de un paciente el uso comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-GPVI que contiene la composición de la invención. Un experto habitual en la materia puede determinar empíricamente la dosificación óptima y la pauta de dosificación para administrar esas composiciones. Sin embargo, una cantidad farmacéuticamente eficaz es la cantidad que proporciona un efecto antritrombótico medible, por ejemplo, una reducción en la frecuencia, grado o probabilidad de trombosis, agregación plaquetaria o activación plaquetaria, medida *in vivo* o *in vitro*, o que proporciona una disminución medible en la probabilidad, frecuencia o grado de enfermedad vascular, formación de coágulos o émbolos o sucesos isquémicos en un paciente.

35 **[0083]** A lo largo del tratamiento puede administrarse una cantidad farmacéuticamente eficaz como una sola dosis o como dosis múltiples. Un kit, dentro del ámbito de la invención, comprende un envase que contiene una o más dosis de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-GPVI que contiene la composición de la invención. Tales kits incluyen anticuerpos anti-GPVI en solitario, mezclados o suspendidos con un diluyente y/u otro excipiente adecuado, farmacéuticamente aceptable, o formulados para mezclarse o suspenderse en un diluyente y/u otro excipiente adecuadamente aceptable antes de la administración.

[0084] Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante cualquier método conocido por los expertos habituales en la materia, por ejemplo, administración intravenosa por inyección en embolada, infusión continua o intermitente. En realizaciones alternativas, las composiciones pueden administrarse por vía intraperitoneal, intracorpórea, intraarticular, intraventricular, intratecal, intramuscular, subcutánea, tópica, amigdalina, mucosa, intranasal, transdérmica, intravaginal, oral o por inhalación.

[0085] Los anticuerpos descritos en el presente documento, específicos contra GPVI, también pueden usarse para explorar compuestos que pueden ser útiles como agentes antitrombóticos. El método de exploración comprende poner en contacto un antígeno GPVI con un compuesto de ensayo y un anticuerpo específico contra GPVI y medir la inhibición de la unión del anticuerpo específico contra GPVI al polipéptido, péptido, o una de sus variantes de origen natural, de GPVI. El antígeno GPVI, el anticuerpo específico contra GPVI y el compuesto de ensayo pueden añadirse en cualquier orden. Por ejemplo, el antígeno GPVI puede ponerse en contacto con el compuesto de ensayo antes de ponerse en contacto con el anticuerpo monoclonal específico contra GPVI. En otro ejemplo, el antígeno GPVI puede ponerse en contacto simultáneamente con el anticuerpo monoclonal específico contra GPVI y el compuesto de ensayo.

[0086] La inhibición de la unión sugiere que el compuesto de ensayo compite por, o de otra manera interfiere con, el mismo sitio de unión sobre GPVI que el anticuerpo específico contra GPVI. En el contexto de exploración para agentes antitrombóticos "antígeno GPVI" se refiere, pero sin limitación, a polipéptidos, péptidos, o sus variantes de origen natural, de GPVI nativos, aislados de plaquetas o de otras células que expresan GPVI; polipéptidos, péptidos o sus variantes de origen natural, de GPVI, recombinantes expresados a partir de células procariotas o eucariotas; o células que expresan polipéptidos, péptidos o sus variantes de origen natural, de GPVI. Un compuesto de ensayo puede ser cualquier compuesto químico, proteína, péptido, polipéptido o ácido nucleico (ADN o ARN). El compuesto de ensayo puede ser de origen natural o puede sintetizarse por métodos conocidos en la técnica. El método de exploración puede

emplear métodos de exploración de alto rendimiento (HTS, siglas en inglés). Los métodos de exploración de alto rendimiento se revisan en Khandurina et al., *Curr Opin Chem Biol.* 6: 359-66 (2002); Kumble, *Anal Bioanal Chem.* 377: 812-819 (2003); y Bleicher et al., *Nature Rev Drug Disc* 2: 369-378 (2003).

5 **[0087]** Un compuesto identificado como que inhibe la unión de un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, específico contra GPVI, a un antígeno GPVI adicionalmente puede someterse a ensayo para determinar su efecto sobre las funciones plaquetarias mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento o mediante otros métodos conocidos en la técnica. Estas funciones plaquetarias inducen la agregación plaquetaria inducida por colágeno, la adhesión plaquetaria inducida por colágeno, la secreción de ATP inducida por colágeno y la formación de tromboxano A₂ inducida por colágeno.

[0088] La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que de ninguna manera pretenden ser limitantes.

15

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos monoclonales contra GPVI

20 **[0089]** Se inmunizaron ratones normales (Balb/c, hembra), hámsteres armenios (macho) y ratones genosuprimidos para GPVI (producidos en Otsuka GEN institute) para producir anticuerpos monoclonales como se describe a continuación.

25 **[0090]** Se generaron ratones genosuprimidos para GPVI como se ha descrito previamente (Mori et al. *Neurosci. Res.* 43: 251-7, 2002). Como se muestra en la Figura 1A, el vector diana se construyó reemplazando un fragmento genómico del gen GPVI (Ezumi Y. et al., *Biochem Biophys Res Comm* 277: 27-36, 2000) de clones λ genómicos de ratón 129/Sv que contenía las 5 últimas bases del exón 2 hasta la primera mitad del exón 3 (Clalsite) con el casete pMC1-neo-polyA (Stratagene). La construcción linealizada se introdujo por electroporación en células AB2.2 ES derivadas de ratón 129/Sv (Lexicon Genetics Inc., The Woodlands, TX) y las células se seleccionaron en G-418. Se exploraron clones de células ES resistentes a G-418 para la recombinación homóloga satisfactoria en los exones 2 y 3 mediante sondeo de ADN genómicos digeridos con SphI- o KpnI con sondas 5' o 3' externas, respectivamente (Figura 1B; datos de transferencia de Southern no mostrados). Para obtener mutantes heterocigotos (F1), los ratones quiméricos derivados de las células ES recombinantes homólogas se aparearon con ratones C57BL/6J. Los mutantes homocigotos (F2) se obtuvieron apareando los mutantes heterocigotos obtenidos y se confirmó por transferencia de Southern. Usando ADN genómico, extraído de cortes de la cola, se realizó el genotipado de los ratones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En los mutantes homocigotos no se observaron anomalías en la tasa de nacimiento, peso al nacer, crecimiento y desarrollo, distribución mendeliana o trastornos hemorrágicos. Como controles se usaron ratones de tipo silvestre y heterocigotos de la misma procedencia. Los hámsteres armenios se obtuvieron en Cytogen Research and Development Inc. Boston, MA. Todos los animales se mantuvieron y se reprodujeron de acuerdo con el protocolo del Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) en Otsuka Maryland Medicinal Laboratories.

40

45 **[0091]** Se inmunizaron ratones normales con plásmidos que contenían ADNc de GPVI ("diana-p"), la línea de células CHO que expresaba la cadena FcR γ de GPVI ("CGP6", en la que la transfección se realizó usando Lipofectamine™ 2000 de Invitrogen), GPVI purificada de células CHO que expresaban FcR γ de GPVI ("PGP6"), GPVI nativa purificada de plaquetas humanas ("nGP6") y GPVI parcial recombinante (que carecía del primer dominio de Ig) expresada en *E. coli* ("PAGP6"). La GPVI nativa de plaquetas humanas y la PGP6 de células transfectadas con FcR γ de DPVI, se purificaron combinando los métodos de de afinidad por lectina, cromatografía de intercambio iónico y afinidad por convulxina descritos en la Publicación de Estados Unidos N° 2003/0186885.

50 **[0092]** Usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) células CHO que expresaban de manera estable GPVI y FcR γ ("CGP6") se establecieron por cotransfección del vector pTarget (Promega) que contenía el ADNc humano de longitud completa de GPVI ("diana-p") y el vector pcDNA3.1(+zeocin (Invitrogen) que contenía ADNc de FcR γ de longitud completa. En medio complementado con G418 y zeocina se seleccionaron células que expresaban ambos receptores. La expresión de GPVI se detectó por análisis FACS con el analizador FACS Epic Altra (Beckman Coulter) usando un anticuerpo policlonal humano anti-GPVI (el suero del doctor Okuma descrito anteriormente) o una convulxina marcada con FITC. La detección de la expresión de FcR γ se realizó por inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales anti-FcR γ disponibles en el mercado (Upstate Biotechnology).

55

60 **[0093]** Se preparó GPVI parcial recombinante insertando en el vector pET21 (Novagen) un ADNc que codificaba un polipéptido de GPVI que carecía del primer dominio completo de Ig de GPVI humana. Esta proteína parcial se expresó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). La proteína expresada ("PAGP6") se purificó de cuerpos de inclusión como describe el fabricante.

[0094] Se inmunizaron hámsteres armenios con CGP6 y plaquetas humanas. Ratones genosuprimidos para GPVI también se inmunizaron con CGP6 y plaquetas humanas.

[0095] Los inmunógenos, excepto la diana-p, se inyectaron por vía intraperitoneal. La diana-p se inyectó por vía intradérmica. Las proteínas recombinantes o purificadas se inyectaron como una emulsión con adyuvante (Titermax Gold, Cytrx Corporation). Algunos de los antígenos se inmunizaron con IL-6 de ratón (500U/inyección) para reforzar el sistema inmunitario. Los animales se inmunizaron hasta obtener un título en suero entre 10-50.000.

[0096] Se produjeron anticuerpos monoclonales por tecnología de hibridoma convencional. Como compañero de fusión, se usaron células P3U1. Para explorar clones de hibridoma positivos, se realizó análisis FACS en el analizador FACS Epic Altra de Beckman Coulter usando células CHO que expresaban la FcR γ de GPVI. Para los animales inmunizados con CGP6, se realizó análisis FACS con células CHO de tipo silvestre transfectadas y no transfectadas con FcR γ -GPVI para diferenciar clones que no produjeron anticuerpos contra GPVI, por ejemplo, anticuerpos contra antígenos relacionados con células CHO.

[0097] Después, células de hibridoma que producían anticuerpos anti-GPVI se cultivaron en medio que contenía suero de ternero fetal al 10% (Invitrogen Corporation, CA) (que contenía pequeñas cantidades de IgG bovina < 1 μ g/ml suero). La IgG se purificó del sobrenadante del cultivo acelular por cromatografía de afinidad con Sepharose con Proteína G (Amersham Biosciences, NJ) o Sepharose con Proteína A (Amersham Biosciences, NJ) en un sistema Waters 650 (Waters Corporation, MA). La IgG de ratón se purificó por cromatografía de afinidad en Sepharose con Proteína G. La IgG de hámster se purificó en Sepharose con Proteína A. La IgG unida a la proteína G se eluyó de la matriz de afinidad con glicina a pH bajo (pH 2,75), se recogió en solución básica para neutralizar el ácido y se dializó en solución salina para su uso en ensayos funcionales. La IgG de los hámsteres unida a la Proteína A se eluyó con un gradiente de pH de 7,5-3,0. El anticuerpo se eluyó a un pH de 4,5. En la mayoría de los casos, el anticuerpo tenía una pureza >90% cuando se analizó en el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technology).

[0098] Usando métodos convencionales, se prepararon fragmentos F(ab')₂ bivalentes de IgG intacta por digestión con papaína. Se preparó una solución de IgG (5 mg/ml) en ácido cítrico 100 mM, pH 6,5 y EDTA 5,0 y se realizó la digestión durante 15 horas a 37 °C con papaína preactivada (sin cisteína) a una proporción de enzima con respecto a IgG de 1:50 (p/p). La reacción se inactivó con yodoacetamida recién preparada y los fragmentos F(ab')₂ se separaron de la IgG y Fc no digeridos por cromatografía de intercambio iónico sobre una columna MonoQ (Amersham Biosciences, NJ). Las fracciones que contenían F(ab')₂ se agruparon, se concentraron y se redujeron/alquilaron para obtener fragmentos Fab monovalentes de acuerdo con el método de Parham et al., J. Immunol. Meth. 53: 133-173 (1982). Finalmente, los fragmentos Fab se purificaron hasta la homogeneidad por cromatografía de exclusión de tamaño sobre Superdex 75 (Amersham Biosciences, NJ). La conversión directa de IgG en fragmentos Fab monovalentes por papaína en presencia de cisteína se impidió porque en algunos casos, la papaína digirió en exceso la IgG, dando lugar a fragmentos Fab inestables e infradimensionados.

[0099] Inicialmente, ratones Balb/c de tipo silvestre se inmunizaron, como se ha descrito anteriormente, con inmunógenos que incluían GPVI purificada de plaquetas humanas ("nGP6"), plásmido que contenía ADNc de GPVI ("diana p"), y células CHO que expresaban el complejo de cadena FcR γ de GPVI ("CGP6"). Véase la Tabla 1. Después de explorar más de 8500 clones, se identificaron 3 clones con afinidad significativa, aunque moderada, por GPVI (dos de CGP6y uno de PGP6). Sorprendentemente, más de 5500 clones que provenían de inmunizaciones con diana p, nGPVI y PAGP6 no produjeron ni un solo clon positivo a GPVI con actividad biológica. En un intento de obtener anticuerpos con afinidad y actividad biológica potenciadas, se inmunizaron diferentes especies de animales. Se inmunizaron hámsteres armenios con CGP6 porque este inmunógeno producía dos clones positivos en ratones de tipo silvestre. Dado que las plaquetas humanas expresan GPVI nativa en su superficie, como inmunógenos también se usaron plaquetas humanas lavadas. Se obtuvieron siete clones positivos para GPVI a partir de inmunizaciones con CGP6 y un clon a partir de inmunización con plaquetas humanas. Véase la Tabla 2.

Tabla 1 Inmunización de Ratones de tipo Silvestre		
Inmunógeno	Nº de clones explorados	Nº de clones positivos
Diana-p	1192	0
CGP6	1953	2
PGP6	1064	1
nGP6	3797	0
PAGP6	764	0
Total	8770	3

Tabla 2 Inmunización de Hámsteres		
Inmunógeno	Nº de clones explorados	Nº de clones positivos
CGP6	1547	7
Plaquetas humanas	1414	1 (OM3)
Total	2961	8

[0100] Después, como hospedadores para la inmunización se usaron ratones genosuprimidos para GPVI (GPVI-KO). Los ratones GPVI-KO carecían de GPVI y no respondían a dosis altas de colágeno y a convulxina (un agonista específico de GPVI). Por lo tanto, se realizó la teoría de que la GPVI inyectado podía ser más antigénica en ratones carentes de GPVI y por lo tanto podían producir anticuerpos contra GPVI que tuviesen alta afinidad por el péptido de GPVI. Los resultados de la inmunización de ratones GPVI-KO se muestran en la Tabla 3. La inmunización de ratones GPVI-KO con suspensiones de plaquetas humanas lavadas no produjeron ningún clon positivo. Sin embargo, a partir de la inmunización de ratones GPVI-KO con CGP6, se obtuvieron ocho clones que tenían alta afinidad por GPVI a juzgar por el gran desplazamiento hacia la derecha en la intensidad de fluorescencia en el análisis FACS.

Tabla 3 Inmunización de Ratones Genosuprimidos para GPVI

Inmunógeno	Nº de clones explorados	Nº de clones positivos
CGP6	13889	8 (incluyendo OM1, OM2 y OM4)
Plaquetas humanas	397	0
Total	4286	8

[0101] Después, las inmunoglobulinas IgG se obtuvieron a partir de clones positivos para GPVI: 3 clones a partir de ratones de tipo silvestre, 8 clones a partir de fusiones de hámsteres y ocho clones a partir de fusiones de ratones GPVI-KO. La IgG se purificó por cromatografía de afinidad usando cualquiera de Proteína G (ratones de tipo silvestre y GPVI-KO) o Proteína A (hámsteres), como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos purificados procedentes de todos los clones indujeron agregación plaquetaria completa a concentraciones de IgG relativamente pequeñas a 0,1-7 µg/ml (17 clones) y 10-30 µg/ml (2 clones), lo que sugería que estos anticuerpos se entrecruzan con GPVI y FcR IIA o se entrecruzan con moléculas de GPVI. Para excluir la posibilidad de entrecruzamiento de FcRIIA-GPVI, se prepararon fragmentos F(ab')₂. En estudios preliminares, se prepararon fragmentos F(ab')₂ a partir de dos anticuerpos activados con plaquetas humanas, aunque en comparación con las IgG intactas fueron necesarias varias concentraciones el doble de altas. Esto confirma que el entrecruzamiento de GPVI con los anticuerpos bivalentes puede ser la causa de la activación plaquetaria observada. Para impedir el entrecruzamiento de GPVI, todos los fragmentos F(ab')₂ se convirtieron a fragmentos Fab por reducción/alquilación. Los fragmentos Fab resultantes no activaron plaquetas humanas cuando se sometieron a ensayo hasta varias concentraciones el doble de altas a las cuales las plaquetas humanas activan la IgG intacta.

Ejemplo 2

Los anticuerpos específicos contra GPVI son fuertes inhibidores de la agregación y adhesión plaquetaria inducida por colágeno

[0102] El potencial inhibidor de los fragmentos Fab preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 se sometió a ensayo sobre las funciones plaquetarias inducidas por colágeno, incluyendo la agregación plaquetaria inducida por colágeno y la adhesión de plaquetas a colágeno inmovilizado en condiciones estáticas y de flujo.

[0103] Los anticuerpos se sometieron a ensayo para determinar la agregación plaquetaria *in vitro* de la siguiente manera. En primer lugar se realizó un experimento de dosificación de colágeno para determinar la cantidad de colágeno que proporcionaría una agregación plaquetaria del 70-90% a los 5 minutos de su adición, dado que la respuesta al colágeno varía entre individuos. Además, el tipo de colágeno usado en los ensayos pueden influir drásticamente en la respuesta. Del experimento, el colágeno de tendón equino insoluble en ácido (Nycomed, Alemania) proporcionó la mayor respuesta de agregación plaquetaria. Nieswandt (J. Biol. Chem. 275: 23998-24002, 2000, y la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2002/0141992), Lecut et al. (J. Thrombosis and Haemostasis 1: 2653-2662, 2003), y Moroi et al. (Thromb. Haemost. 89: 996-1003, 2003) también usaron colágeno de tendón equino insoluble en ácido, mientras que otros usaron una forma menos sensible de colágeno, por ejemplo, fibras de colágeno bovino de tipo I (Smethurst et al., Blood 103: 903-911, 2004, y documento WO 03/054020). En los ensayos ilustrados a continuación, se usó colágeno de tendón equino insoluble en ácido 1-4 µg/ml (Nycomed, Alemania) para examinar el efecto inhibidor de una preparación de Fab particular sobre la agregación plaquetaria. El tipo de colágeno usado fue el mismo que el usado en Qian et al. (Human Antibodies 11: 97-105, 2002), documento WO 01/00810, documento WO 02/080968 y sus solicitudes relacionadas; pero como se indica a continuación, los anticuerpos contra GPVI de la presente invención presentan un efecto inhibidor significativamente superior en comparación con los anticuerpos contra GPVI descritos en Qian, documentos WO 01/00810 y WO 02/080968.

[0104] El ensayo de agregación plaquetaria se realizó recogiendo sangre en un volumen de 1/10 de citrato de trisódico al 3,8% como un anticoagulante (Nakamura et al., J. Biol. Chem. 273(8): 4338-44, 1998). El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación de sangre completa a 180 x g durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Antes de realizar los estudios de agregación plaquetaria se realizó el recuento de plaquetas y se ajustó a 3-4x10⁹ plaquetas/ml en plasma pobre en plaquetas. Todos los experimentos se realizaron 3-4 horas después de la recogida de sangre y el PRP se mantuvo a temperatura ambiente todo el rato. Los estudios de agregación se realizaron en un agregómetro de cuatro canales AG10 (Kowa, Japón) que mide la cinética de la formación de partículas por dispersión láser y agregación por transmisión lumínica a 650 nm en la región visible del espectro lumínico. El PRP se

incubó a 37 °C con diversas cantidades de fragmentos Fab durante 10 minutos (5 minutos sin agitación seguido de 5 minutos más con agitación) antes de la adición del colágeno de tendón equino insoluble en ácido (Nycomed, Alemania) y la agregación se controló durante 5-10 minutos más.

5 **[0105]** La adhesión de las plaquetas al colágeno en condiciones estáticas se examinó usando un procedimiento modificado de Nakamura et al., J. Biol. Chem. 273: 4338-4334 (1998) descrito anteriormente. Brevemente, se incubaron plaquetas lavadas con cantidades deseadas de fragmentos Fab durante 30 minutos en presencia y ausencia de Mg^{2+} , a temperatura ambiente, antes de su adición a los pocillos recubiertos con colágeno (2 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ con colágeno de tendón equino insoluble en ácido) (Nycomed, Alemania). Después de 60-90 minutos de incubación a temperatura ambiente, las plaquetas no adheridas se eliminaron mediante un lavado suave con solución salina tamponada y la adhesión se cuantificó determinando el contenido de LDH de las plaquetas adheridas usando un kit para LDH disponible en el mercado (Promega, MA).

15 **[0106]** La adhesión plaquetaria a colágeno inmovilizado en condiciones de flujo se midió en una cámara de flujo desarrollada por Glycotech (Rockville, MD). Se incubó sangre completa, anticoagulada con hirudina recombinante (50 unidades/ml), con una solución que contenía el fragmento Fab durante 15 minutos a 37 °C antes de extraerse a través de una cámara de flujo recubierta con colágeno (colágeno de tendón equino insoluble en ácido 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Nycomed, Alemania) a alta cizalla (2600 s^{-1} , 2min). Las plaquetas no adheridas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y las plaquetas adheridas se fijaron con glutaraldehído (0,5% p/v, 1 h) y se tiñeron con azul de toluidina/borato sódico (0,05%, 5 min). La cobertura de la superficie de las plaquetas se calculó por análisis digital de formación de imágenes. Se usó el promedio de 10 imágenes no solapantes para determinar el porcentaje de cobertura del área de superficie.

25 **[0107]** De los anticuerpos seleccionados, los fragmentos Fab de las cuatro IgG, OM1, OM2, OM3 y OM4, inhibieron la agregación plaquetaria inducida por colágeno en plaquetas humanas. Véanse las Tablas 2, 3 y 4. El orden de la fuerza inhibidora de los fragmentos Fab contra la agregación plaquetaria inducida por colágeno fue OM1 >OM2>OM3>OM4. En la Tabla 4 se muestran los valores promedio de CI_{50} y DT de cada anticuerpo para la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno.

30 **[0108]** También se sometió a ensayo la reactividad cruzada de cada anticuerpo contra plaquetas de rata, perro y mono. La sangre de mono y de perro se adquirieron en Covance Research Inc, Viena, VA. Se obtuvieron ratas Sprague Dowley de Charles River Laboratories, Willmington, MA. Los cuatro fragmentos Fab inhibieron la agregación de plaquetas de mono inducida por colágeno. De manera interesante, OM4 reaccionó en cruzado con las plaquetas de rata. Estos anticuerpos específicos contra GPVI son herramientas útiles para ensayar el efecto de anticuerpos específicos contra GPVI en modelos animales. Los hibridomas productores de anticuerpos OM1, OM2, OM3 y OM4 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) el 29 de abril de 2004, como números de la ATCC PTA-5938, PTA-5939, PTA-5940 y PTA-5941, respectivamente.

40 **Tabla 4: Efecto de los Fragmentos Fab Anti-GPVI sobre la Agregación de Plaquetas Humanas Inducida por Colágeno y Reactividad Cruzada a Plaquetas no Humanas.**

Fragmento Fab ID	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)*		Reactividad cruzada**		
	Promedio	DT	Rata	Perro	Mono
OM1	0,575	0,049	(-)	(-)	(+)
OM2	1,69	0,506	(-)	(-)	(+)
OM3	3,02	0,768	(-)	(-)	(+)
OM4	7,0	5,5	(+)	(-)	(+)
ReoPro [®]	1,71	0,345	(-)	(+)	(+)
F(ab') ₂ 7E3	n/d***	n/d	(+)	n/d	n/d

* La curvas de respuesta a la dosis se obtuvieron usando plaquetas de 3 sujetos diferentes.

Los valores CI_{50} se calcularon por análisis sin regresión. Los valores son el promedio \pm DT de 3 experimentos.

45 ** La reactividad cruzada con las plaquetas de animales se basó en la capacidad de los fragmentos Fab individuales para inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno y por desplazamiento positivo a la derecha en análisis FACS. Un signo (+) indica inhibición de agregación por fragmentos Fab inducida por colágeno y desplazamiento positivo a la derecha mientras que un signo (-) indica que no hay reacción en ninguno de los dos ensayos.

*** No determinado.

50 **[0109]** Para la comparación, ReoPro[®] (Centocor, Inc.), un fragmento Fab anti-GPIIb-IIIa quimérico de ser humano-ratón y un fragmento F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal anti-GPIIb-IIIb 7E3 (Colter y Scudder, Blood 66: 1456-1459, 1985), se sometieron a ensayo en varios de los mismos donantes en las mismas condiciones usadas para someter a ensayo los anticuerpos específicos contra GPVI. ReoPro[®] inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno a una CI_{50} de 1,71 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por tanto, OM1 poseyó un mayor potencial inhibidor que ReoPro[®], mientras que OM2 fue

equipotente a ReoPro[®]. ReoPro[®] fue 2-4 veces más potente que OM3 y OM4 en este ensayo. El F(ab')₂ de 7E3 reaccionó en cruzado con plaquetas de rata, mientras que ReoPro[®] no lo hizo (véase la Tabla 4).

[0110] También se sometió a ensayo el efecto de los fragmentos Fab sobre la adhesión plaquetaria en condiciones estáticas. La adhesión se realizó en presencia (dependiente de GPIIa y GPVI) y ausencia (dependiente de GPVI) de Mg²⁺. La adhesión independiente de Mg²⁺ depende exclusivamente de la presencia de GPVI y se inhibió por los cuatro Fab a concentraciones relativamente bajas (con una variación de CI₅₀ de 0,1-1 µg/ml) como se muestra en la Figura 2. OM1, OM2 y OM3 tuvieron actividad inhibitoria similar (intervalo de CI₅₀ de 0,1-0,2 µg Fab/ml) mientras que OM4 necesitó una dosis ligeramente más alta para conseguir una inhibición similar (intervalo de CI₅₀ 0,2-1 µg Fab/ml). El proceso de adhesión dependiente de Mg²⁺ necesitó dosis relativamente más altas de fragmentos Fab que las necesarias para el proceso de adhesión independiente de Mg²⁺ (véase la Figura 2). Sin embargo, ninguno de los Fab fue capaz de bloquear completamente la adhesión dependiente de Mg²⁺ de las plaquetas al colágeno.

[0111] El efecto de los fragmentos Fab sobre la adhesión plaquetaria independiente de Mg²⁺ en condiciones estáticas se repitió usando dosis incluso inferiores (0,001-1 µg Fab/ml). Como se muestra en la Figura 3, los fragmentos Fab OM2 y OM4 inhibieron la adhesión plaquetaria un 40-60% a 0,1 µg Fab/ml y los fragmentos Fab OM1 y OM3 inhibieron la adhesión un 10-20% a la misma concentración. Esta discrepancia puede deberse a una variación de lote y a una variabilidad del donante. En conclusión, la serie OM de fragmentos Fab inhibe eficazmente la (adhesión independiente de Mg²⁺) dependiente de GPVI a concentraciones inferiores que 0,5 µg/ml.

[0112] El efecto inhibitor de los fragmentos Fab anti-GPVI sobre adhesión plaquetaria también se sometió a ensayo en condiciones más próximas a situaciones *in vivo*, como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos Fab de OM1, OM2, OM3, OM4 inhibieron significativamente la adhesión plaquetaria al colágeno inmovilizado en condiciones de alta cizalla (2600 s⁻¹). En comparación con una muestra de control, los Fab anti-GPVI indujeron cambios drásticos en el tamaño y morfología de los agregados (Figura 4). En comparación, ReoPro[®] (Centocor, Inc.) también impidió la formación de agregados pero se observó una capa uniforme de plaquetas individuales sobre las fibras de colágeno (Figura 4).

[0113] La morfología de los agregados es un resultado de dos sucesos: (1) el área cubierta por una monocapa de plaquetas primaria y (2) formación posterior de agregados añadiendo así una dimensión de volumen a todo el conjunto descrito. La reducción drástica en la formación de agregados junto con la cobertura superficial por el Fab anti-GPVI sugiere que la GPVI no solo está implicada en el proceso de adhesión primario sino que también desempeña una importante función en los sucesos posteriores a la adhesión, incluyendo la activación plaquetaria y el desarrollo de trombo posterior.

[0114] Los ensayos de agregación y de adhesión demuestran que los fragmentos Fab de los anticuerpos de la invención específicos contra GPVI, tales como OM1, OM2, OM3 y OM4 son fuertes inhibidores de las funciones plaquetarias. Estos son más fuertes inhibiendo la agregación plaquetaria inducida por colágeno que el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal de ratón 9012.2 generado a partir de ratones inmunizados con un ADNc que codifica la proteína de fusión GPVI-Fc recombinante soluble (rsGPVI-Fc) como se describe en Lucet et al. (J. Thrombosis and Haemostasis 1: 2653-2662, 2003), documento WO 02/80968, y la Publicación de Patente de Estados Unidos 2004/0253236. Adicionalmente, los anticuerpos OM son más potentes inhibiendo la adhesión independiente de Mg²⁺ a colágeno que el fragmento Fab 9012.2.

[0115] Nieswandt (J. Biol. Chem. 275: 23998-24002, 2000, y la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2002/0141992) publicaron un anticuerpo monoclonal de rata contra la GPVI de ratón, JAQ1. Sin embargo, concentraciones de saturación de JAQ1 (20 µg/ml) solo presentaron un efecto inhibitor limitado sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno (véase la Publicación de Patente de Estados Unidos 2002/0141992, párrafo 29). Además, JAQ1 no reconoció la GPVI humana en análisis FACS o transferencia de Western en los experimentos de los autores de la presente invención ni de otros (véase Takayama et al., J. Thrombosis and Hemostasis 14: 75-81, 2003).

[0116] Otros autores han generado Fvs monocatenarios (ScFvs, de las siglas en inglés single chain). Por ejemplo, Qian et al. (Human Antibodies 11: 97-105, 2002) publicaron un anticuerpo Fv monocatenario (ScFv) de GPVI que tenía una CI₅₀ de 80-90 µg/ml en un estudio de agregación plaquetaria inducida por colágeno, usando 2 µg/ml del mismo colágeno usado en la presente invención. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención específicos contra GPVI son significativamente más fuertes inhibiendo la agregación plaquetaria inducida por colágeno en comparación con Qian et al. Los ScFv también publicados en los documentos WO 01/00810 y WO 02/80968 y en sus solicitudes relacionadas necesitaban una concentración significativamente mayor (110-150 µg/ml de ScFv) para inhibir la agregación plaquetaria inducida por colágeno en comparación con los anticuerpos de la presente invención específicos contra GPVI.

[0117] De manera similar, Smethurst et al. (Blood 103: 903-911, 2004, y el documento WO 03/054020), describieron un anticuerpo ScFv de GPVI que tenía una CI₅₀ de 12-16 µg/ml en la agregación plaquetaria inducida por colágeno. En comparación, OM1, OM2, OM3 y OM4 son más fuertes que el ScFv de Smethurst. Adicionalmente, aunque las Patentes

de Estados Unidos N° 6.245.527 y 6.383.779 desvelan anticuerpos anti-GPVI, no proporcionan ningún ejemplo de anticuerpos anti-GPVI que sean tan fuertes inhibiendo la agregación plaquetaria inducida por colágeno que los de la presente invención.

5

Ejemplo 3

Los anticuerpos específicos contra GPVI inhiben la secreción inducida por colágeno y la formación de tromboxano A₂

10 **[0118]** Los fragmentos Fab de los anticuerpos de la presente invención específicos contra GPVI también se sometieron a ensayo para determinar su efecto sobre la secreción inducida por colágeno y la formación de tromboxano A₂ (TXA₂). Secreción se refiere a una liberación de contenido bioactivo inducido por antagonista de gránulos alfa y densos de plaquetas.

15 **[0119]** Una manera de cuantificar la liberación inducida por agonistas es medir el contenido de ATP en el medio mediante ensayo luciferasa usando un método basado en quimioluminiscencia. Plasma rico en plaquetas (PRP) se sometió a ensayo para detectar la secreción de ATP inducida por colágeno usando un Lumi-agregómetro (Chronolog Corporation, PA) y un reactivo de luciferasa-luciferina. El Lumi-agregómetro mide simultáneamente la agregación plaquetaria inducida por agonista y la secreción de ATP. En resumen, con una jeringa se extrajo sangre humana directamente en citrato trisódico al 3,8% (volumen de sangre:citrato 9:1). Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 180xg durante 15 minutos. El PRP (360 µl) se mezcló con 40 µl de reactivo luciferasa-luciferina (Chrono-lume; Chronolog Corporation, PA) y la mezcla se incubó con diversas cantidades de los Fab del ensayo, ReoPro[®] o control durante 5 minutos a 37 °C. A los cinco minutos se añadieron 1-4 µg/ml de colágeno (colágeno de tendón equino insoluble en ácido) (Nycomed, Alemania) y la agregación y la secreción de ATP se controlaron durante 20
25
ocho minutos. Al final de la reacción (10-11 minutos), se añadió una cantidad conocida de solución ATP para obtener una desviación que se usó para calcular la cantidad de ATP secretada por las plaquetas después de la exposición al antagonista.

30 **[0120]** La formación de tromboxano A₂ se midió en muestras paralelas usadas anteriormente. Diez minutos después de la etapa de adición de colágeno anterior, se añadieron 500 µl de solución de detención (EDTA 50 mM, indometacina 2 mM en NaCl 130 mM) a 200 µl de PRP para finalizar la formación de tromboxano A₂. La suspensión se centrifugó a 1000xg durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se congeló a -20 °C hasta someter a ensayo para tromboxano B₂, que es un metabolito estable del tromboxano A₂. El tromboxano B₂ se cuantificó usando un kit disponible en el mercado (Thromboxane B₂ Biotrak Assay, Amersham).

35

[0121] Todos los fragmentos Fab de los anticuerpos OM1, OM2, OM3 y OM4 inhibieron fuertemente la liberación de ATP inducida por colágeno de las plaquetas humanas (Tabla 5). OM1 mostró inhibición de más del 90% a 1 µg/ml. OM2, OM3 y OM4 también consiguieron inhibición de más del 90% a 3 µg/ml. ReoPro[®] fue menos eficaz inhibiendo la secreción de ATP que los anticuerpos anti-GPVI, lo que sugiere que los Fab anti-GPVI son mejores inhibidores de la liberación de ATP inducida por colágeno. Se sabe que los agonistas secundarios liberados de plaquetas sinergizan el desarrollo de trombos. Por lo tanto, inhibidores de la secreción inducida por colágeno, tales como los anticuerpos de la presente invención específicos contra GPVI, son fuertes inhibidores del desarrollo de trombos.

40

Tabla 5: Efecto de Fragmentos Fab anti-GPVI sobre la Liberación de ATP Inducida por Colágeno Procedente de Plaquetas Humanas*

45

anticuerpo	concentración (µg/ml)	% de inhibición (media ± DT)
OM1	1	97,6 ± 2,1
	3	96,8 ± 6,3
OM2	1	63,6 ± 41,6
	3	97,7 ± 2,7
OM3	1	72,8 ± 23,7
	3	94,2 ± 0,4
OM4	1	50,0 ± 29,5
	3	91,3 ± 5,2
ReoPro [®]	1	18,0 ± 13,5
	3	56,9 ± 31,7

* Los resultados se obtuvieron a partir de 4 donantes de plaquetas diferentes.

50 **[0122]** Los fragmentos Fab de OM1, OM2, OM3 y OM4 también inhibieron fuertemente la generación de tromboxano A₂ inducida por colágeno (Tabla 6). Entre los cuatro fragmentos Fab sometidos a ensayo, OM1 mostró inhibición de más

del 90% a 1 µg/ml. OM2 y OM3 también consiguieron inhibición de más del 90% a 3 µg/ml. OM4 inhibió la formación de tromboxano A₂ aproximadamente un 86% a 3 µg/ml. Por el contrario, ReoPro[®] mostró escaso o ningún efecto inhibitor sobre la formación de tromboxano a 1 y 3 µg/ml. También se observó que el bloqueo de GPVI inhibe la generación de TXA₂ y la expresión de un complejo IIb-IIIa activado sobre plaquetas adheridas a colágeno (Nakamura et al., J. Biol. Chem. 273: 4338, 1998; Nakamura et al., J. Biol. Chem. 274: 11879, 1999). Por lo tanto, la inhibición de la generación de TXA₂ por los fragmentos Fab anti-GPVI sugiere que los anticuerpos de la presente invención específicos contra GPVI inhiben los sucesos de señalización aguas arriba lo que conduce a la expresión del complejo IIb-IIIa activado y finalmente, seguido de una atenuación en el desarrollo de trombos.

Tabla 6 - Efectos de Fragmentos Fab sobre Anticuerpos Anti-GPVI sobre la Formación de Tromboxano A₂ Inducida por Colágeno en Plaquetas Humanas*

anticuerpo	concentración (µg/ml)	ng/3x10 ⁸ plaquetas (media ± DT)
control		104,3 ± 37,4
OM1	1	5,0 ± 3,4
	3	2,9 ± 2,7
OM2	1	31,5 ± 36,5
	3	5,0 ± 3,3
OM3	1	24,1 ± 10,6
	3	6,9 ± 4,8
OM4	1	28,7 ± 8,1
	3	14,5 ± 4,9
ReoPro [®]	1	77,8 ± 35,1
	3	106,7 ± 70,9

* Los resultados se obtuvieron usando plaquetas de 4 donantes diferentes

Ejemplo 4

Afinidades de unión y reactividad de fragmentos Fab de anticuerpos anti-GPVI contra GPVI

[0123] Las afinidades de unión se determinaron de acuerdo con el método de Fujimura et al. Thromb Haemost 87: 728-34 (2002). En la determinación de las afinidades de unión se usaron anticuerpos marcados con ¹²⁵I preparados a partir de IgG no marcadas de acuerdo con el método de perla-yodo (Pierce, IL). En resumen, una perla-yodo se sumergió durante 5 minutos en tampón de yodinación que contenía Na ¹²⁵I sin transportador 0,5 mCi (Amersham) seguido por la adición de una IgG candidata (100 µg). Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se aplicó a una columna PD10 (Amersham) para separar la IgG unida a ¹²⁵I del yodo libre. Las fracciones que contenían IgG-¹²⁵I se eluyeron de la columna y un volumen pequeño (1 µl) se sometió a precipitación con TCA. Tanto el sedimento precipitado como el sobrenadante resultante se contaron en un contador gamma para

cuantificar la incorporación de ^{125}I en la IgG. Las fracciones con recuentos máximos en el precipitado (<95%) se agruparon y se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm para determinar la concentración de proteína. Se realizó un recuento de un volumen conocido en un contador gamma para obtener la actividad específica de la IgG marcada. La actividad específica entre diversos anticuerpos varió de 0,33-0,97 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de IgG.

5 **[0124]** Las afinidades de unión se determinaron incubando plaquetas humanas lavadas ($5 \times 10^8/\text{ml}$) con IgG- ^{125}I 1 nM en presencia y ausencia de diversas concentraciones de IgG homóloga no marcada (0-500 nM) durante 1 hora. Las radioactividades libres y unidas se separaron estratificando la mezcla sobre BSA (10% de solución en solución salina) y se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 10 minutos. Después de eliminar con cuidado el sobrenadante y el amortiguador de BSA, la punta del tubo se cortó y la radioactividad del sedimento se contó en un contador gamma. Para evaluar la unión individual de la IgG individual se desarrollaron de ocho a diez isoterms de unión de competencia de punto triplicado. Los datos se analizaron usando el programa informático de análisis de regresión no lineal, Prism (GraphPad Software Inc. CA).

15 **[0125]** Los experimentos de afinidad de unión revelaron que los cuatro anticuerpos se unían con avidez a plaquetas con afinidades que variaban de 0,7-1,7 nM (Tabla 7). Los anticuerpos de la presente invención se compararon con las afinidades de unión de los anticuerpos descritos en la técnica: ReoPro[®] ($K_d=6,25 \pm 2,6 \times 10^{-9}$ M) (de Sassoli et al Thromb Haemost 85: 868-902, 2001), scFv-10B12 ($K_d=7,9 \times 10^{-7}$ M) (de Smethurst et al, Blood 103: 903-91, 2004) y 9012.2-IgG ($K_d=18 \times 10^{-9}$ M) (del documento WO 02/080968). ReoPro[®] y scFv -10B12 son fragmentos monovalentes mientras que la serie OM usada en este ejemplo y 9012.2 son IgG. Los cuatro anticuerpos OM se unieron con mayor afinidad a las plaquetas humanas que las indicados para ReoPro[®], scFv -10B12 y 9012.2-IgG (Tabla 7). Los fragmentos monovalentes generalmente tienen afinidades algo más reducidas en comparación con su correspondiente IgG intacta; sin embargo, no se esperaba que esta reducción fuese significativa.

25 **Tabla 7. Afinidades de Unión de Anticuerpos Anti-GPVI**

ID Anticuerpo	Kd	μg IgG/ml
OM1	$1,724 \pm 0,22 \times 10^{-9}$ M	$0,258 \pm 0,033$
OM2	$0,723 \pm 0,093 \times 10^{-9}$ M	$0,108 \pm 0,0103$
OM3	$0,8187 \pm 0,14 \times 10^{-9}$ M	$0,1220 \pm 0,022$
OM4	$0,785 \pm 0,25 \times 10^{-9}$ M	$0,117 \pm 0,037$
ReoPro [®] *	$6,25 \pm 2,6 \times 10^{-9}$ M	$0,31 \pm 0,13$
scFv - 10B12**	$7,9 \times 10^{-7}$ M	23,7
9012.2- IgG***	18×10^{-9} M	2,7

El estudio de unión de la serie OM procede de un solo experimento usando plaquetas de individuos diferentes. Cada punto de datos se procesó por triplicado.

30 *Datos procedentes de Sassoli et al. Thromb Haemost 85: 868-902 (2001).

** Datos procedentes de Smethurst et al., Blood 103: 903-911 (2004). 10B12 es un anticuerpo scFv específico humano contra GPVI obtenido a partir de un método de presentación de fagos.

*** Datos del documento WO 02/080968. 9012.2 es un anticuerpo anti-GPVI monoclonal.

35 **[0126]** Para determinar la reactividad de los anticuerpos de la serie OM contra GPVI de diversas especies se realizó transferencia de Western. Plaquetas ($1 \times 10^8/\text{ml}$) de diversas especies se disolvieron en SDS al 2% que contenía EDTA, EGTA, PMSF y NEM (cada uno 1mM). Las proteínas se separaron sobre minigeles en gradiente de Tris-glicina pre-colados al 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, CA) y las proteínas resueltas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad CA). Se seccionaron carriles individuales y bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-T (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,5%) durante 60 minutos. Se incubaron tiras de nitrocelulosa con anticuerpos OM (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o convulxina biotinilada durante una noche a 4 °C. Las membranas se lavaron bien con TBS-T y se exploraron con IgG de cabra anti-ratón (OM1, OM2 y OM4) conjugada con HRP, IgG de cabra anti-hámster (OM3) conjugada con HRP o con estreptavidina-HRP (convulxina biotinilada) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces con un gran exceso de TBS-T. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron usando un sistema de detección quimioluminiscente potenciado (ECL- Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK).

45 **[0127]** Los cuatro anticuerpos OM reaccionaron con la GPVI desnaturalizada de plaquetas humanas en inmunotransferencias (Figura 5). Se observó reactividad similar con plaquetas de mono (transferencias no mostradas). Ningún anticuerpo reaccionó con las plaquetas de ratón, cerdo, perro, conejo o cobayas. Solo OM4 reaccionó positivamente con lisado plaquetario de rata. Estos datos sugieren que toda la serie de anticuerpos OM reconoce a la GPVI en plaquetas de seres humanos y monos mientras que OM adicionalmente reconoce la GPVI en plaquetas de ratas.

Ejemplo 5

Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR)

5 **[0128]** Se determinaron las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de OM1, OM2, OM3 y OM4.

10 **[0129]** Usando TRIzol (Invitrogen), se aisló ARN total de hibridomas de OM1, OM2, OM3 y OM4. El ADNc se sintetizó con el Sistema de Primera Cadena SuperScript (Invitrogen) usando cebadores al azar. Las secuencias de ADN que corresponden a las regiones variables de anticuerpos se amplificaron después por reacción en cadena de polimerasa usando ADN Polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen) con una mezcla de Cebadores Pesados o Cebadores Ligeros (Amersham). El ADN amplificado se ligó en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) y la construcción resultante se transformó en células químicamente competentes usando el kit de Clonación TOPO TA (Invitrogen). Las células transformadas se cultivaron en presencia de kanamicina y el plásmido amplificado se aisló usando el Kit II Miniprep Plasmid E.Z.N.A. (Omega Bio-tek). Las secuenciación del ADN insertado se realizó sobre el Analizador Genético ABI PRISM 310 usando el Kit de Secuenciación de Ciclo ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Las secuencias de ADN se analizaron y se convirtieron en secuencias de aminoácidos usando el programa informático OMIGA 2.0 (Oxford Molecular).

20 **[0130]** En la Tabla 8 se muestran las CDR de OM1, OM2, OM3 y OM4.

Tabla 8: Secuencias CDR de Anticuerpos Anti-GPVI

OM1

25 H1 : SYWMN (SEC ID Nº: 1)
 H2: MIHPDSEITLNQKFKD (SEC ID Nº: 2)
 H3: DDYYDSSSHALDY (SEC ID Nº: 3)
 L1: RASQSVSTSTYSIY (SEC ID Nº: 4)
 L2: FASYLES (SEC ID Nº: 5)
 L3: QHIWEIPWTF (SEC ID Nº: 6)

OM2

35 H1 : DHYIS (SEC ID Nº: 7)
 H2: WIYPGYGNIRYNEKFKG (SEC ID Nº: 8)
 H3: SADGYFRYFDV (SEC ID Nº: 9)
 L1 : RASGNIHNYLA (SEC ID Nº: 10)
 L2: NSEILAD (SEC ID Nº: 11)
 L3: QHFWTAPPTF (SEC ID Nº: 12)

OM3

40 H1 : DFYMN (SEC ID Nº: 13)
 H2: SISGGSSDIKYADVVKG (SEC ID Nº: 14)
 H3: WGDHWLDY (SEC ID Nº: 15)
 L1: QASQNIGNELN (SEC ID Nº: 16)
 L2: GASSLYP (SEC ID Nº: 17)
 L3: KQDLNYPITF (SEC ID Nº: 18)

OM4

50 H1: SFGMH (SEC ID Nº: 19)
 H2: FISSGSSTIYYADIVKG (SEC ID Nº: 20)
 H3: SGYANAMDY (SEC ID Nº: 21)
 L1 : KASQDVSPAVT (SEC ID Nº: 22)
 L2: WASTRHT (SEC ID Nº: 23)
 L3: QQHYSFPWTF (SEC ID Nº: 24)

Ejemplo 6

GPVI y trombosis

60 **[0131]** La función de la GPVI en la trombosis se había observado en un estudio anterior usando ratones con poca GPVI o carentes de GPVI/KO - FcR γ (Nieswandt et al., The EMBO Journal 20: 2120-2130 (2001)). Los ratones con poca GPVI o carentes de GPVI/KO - FcR γ carecen de la cadena FcR γ . En ese ejemplo, la implicación de GPVI en la trombosis se confirmó usando ratones GPVI-KO que no carecen de la cadena FcR γ .

[0132] Se desarrollaron ratones genosuprimidos para GPVI, como se ha descrito anteriormente. Las plaquetas de estos ratones no responden a altas dosis de colágeno (20 $\mu\text{g/ml}$) ni al antagonista específico de GPVI, la convulxina (3 $\mu\text{g/ml}$), pero responden normalmente al ADP (5 μM) (Figura 6). Los ratones heterocigotos carentes de GPVI que producían la mitad de la cantidad de GPVI en comparación con los de tipo silvestre mostraron respuestas reducidas al colágeno y a convulxina aunque se observaron respuestas normales después de aumentar la dosis agonista (Figura 6). Estas observaciones confirman la función papel de GPVI como un receptor de colágeno dominante sobre la superficie de las plaquetas.

[0133] La función de GPVI en la trombosis y en la homeostasis se sometió en primer lugar a ensayo por co-inyección de colágeno-epinefrina, que normalmente induce un tromboembolismo pulmonar letal (véase la Tabla 9). Los ratones se anestesiaron con ketamina/xilacina (150/15 mg/kg, IP) y se inyectó una mezcla de colágeno y epinefrina (800/60 $\mu\text{g/kg}$) en la vena yugular derecha. Después los animales se observaron durante 15 minutos y se clasificaron de la siguiente manera: (a) animales que sucumbieron a la muerte a los 10 minutos de la inyección y (b) animales que sobrevivieron mostrando distrés respiratorio transitorio, que mejoraron a los 10 minutos. Las heridas quirúrgicas de los animales supervivientes se suturaron y los animales volvieron a la instalación animal. Aproximadamente el 83% (15 de 18) de los ratones de tipo silvestre GPVI murieron a los 15 minutos de la inyección. Todos los ratones carentes de GPVI heterocigotos (18 de 18) murieron a los cinco minutos de la inyección. A diferencia de los animales de tipo silvestre y heterocigotos, aproximadamente el 55% de los ratones GPVI-KO (homocigotos) sobrevivieron a la inyección letal de colágeno y epinefrina, lo que sugiere que GPVI desempeña una importante función en el tromboembolismo pulmonar inducido por la inyección de colágeno.

Tabla 9. La función de GPVI en el Tromboembolismo Pulmonar

Genotipo	número de animales supervivientes	% de supervivencia
Tipo silvestre (+/+)	3/18	~16
Heterocigoto (+/-)	0/18	0
Homocigoto (-/-)	10/18	~55

[0134] Como se muestra en la Tabla 10, los ratones genosuprimidos para GPVI tuvieron esencialmente los mismos tiempos de sangrado en la cola que los ratones de tipo silvestre y heterocigotos. Los tiempos de sangrado de los ratones genosuprimidos para GPVI se compararon con los de los ratones genosuprimidos carentes de integrina $\beta 3$, que también se encontró en plaquetas y que está implicado en la agregación plaquetaria y trombosis (Kairbaan et al., J. Clin. Invest. 103: 229-238, 1999). A diferencia de los ratones carentes de GPVI, los ratones genosuprimidos para $\beta 3$ homocigotos sangraron de manera continua. Por lo tanto, la administración de fragmentos Fab anti-GPVI *in vivo* puede ser inocua y no debe influenciar significativamente en el tiempo de sangrado porque el tiempo de sangrado en los ratones genosuprimidos para GPVI es similar al de los ratones de tipo silvestre.

Tabla 10. Tiempo de Sangrado en la Cola en Ratones de Tipo Silvestre, Heterocigotos y Homocigotos: Comparación con Ratones Genosuprimidos para $\beta 3$

Genotipo	Tiempo de sangrado en la cola (segundos)	
	Genosuprimido para GPVI	Genosuprimido para $\beta 3^*$
Tipo silvestre (+/+)	191 \pm 186 (n=9)	156 \pm 89(n=15)
Heterocigoto (+/-)	190 \pm 193 (n=14)	156 \pm 99 (n=15)
Homocigoto (-/-)	165 \pm 110 (n=13)	>600 (n=15)**

* J Clin Invest 103: 229, 1999

** Significativamente diferente de ratones de tipo silvestre y heterocigotos. En la mayoría de los casos, el sangrado tuvo que detenerse manualmente para impedir la muerte.

[0135] Para confirmar además el papel de GPVI en la trombosis, sangre completa de ratones de tipo silvestre, heterocigotos y GPVI-KO se perfundió sobre cubreobjetos revestidos con colágeno de tipo I a una fuerza de cizalla de 2600 s^{-1} . Las plaquetas procedentes de ratones GPVI-KO no se adhirieron a fibras de colágeno mientras que las plaquetas de ratones de tipo silvestre y GPVI-heterocigotos se adhirieron a las fibras de colágeno y formaron grandes trombos. No hubo diferencias en la cobertura superficial ni en la morfología de trombos entre los ratones de tipo silvestre y GPVI heterocigotos (Figura 7).

Ejemplo 7

Efecto del fragmento Fab OM2 en la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* y tiempo de sangrado cutáneo en monos *cynomolgus*

[0136] Estudio de aumento escalonado de la dosis. Adicionalmente, el fragmento Fab de OM2 se evaluó porque en un ensayo de agregación plaquetaria inducida por colágeno *in vitro*, usando plaquetas de monos *Cynomolgus*, mostró el

efecto inhibitor más fuerte entre los anticuerpos OM. El fragmento Fab de OM2 se administró por inyección intravenosa a monos *Cynomolgus* en aumentos escalonados de la dosis y se evaluó su efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* y el tiempo de sangrado cutáneo. ReoPro[®] se sometió a ensayo de una manera similar.

5 [0137] Después de anestesia por inhalación, el fragmento Fab de OM2 o ReoPro[®] se inyectaron por vía intravenosa en la vena cefálica del antebrazo a intervalos de 1 hora. Treinta minutos después de cada inyección, para medir la agregación plaquetaria inducida por colágeno, se extrajo la sangre. Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP) por centrifugación secuencial de sangre que se anti-coaguló con citrato trisódico. La agregación plaquetaria se midió mediante el método turbidimétrico 1 hora después de la extracción de la sangre. Las concentraciones de colágeno usadas para inducir la agregación plaquetaria eran entre 5 y 20 µg/ml, dependiendo del grado de reacción de las plaquetas de cada mono. El tiempo de sangrado cutáneo se midió 30 minutos después de cada inyección del anticuerpo comprimiendo el músculo del antebrazo con un manguito a 40 mm Hg y realizando una incisión en la piel con un dispositivo de tiempo de Sangrado Triplett (Helena Laboratory). La sangre que fluía de la herida se absorbió con papel de filtro y el tiempo de sangrado se midió hasta detener el sangrado o hasta 1800 s. La dosis acumulativa de anticuerpo se usó para evaluar los efectos de los anticuerpos.

10 [0138] El fragmento Fab de OM2 ejerció un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Figura 8). A la dosis acumulativa de 0,2 mg/kg o superior, el fragmento Fab de OM2 inhibió la agregación plaquetaria más del 80%.

20 [0139] ReoPro[®] también ejerció un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Figura 8) pero inhibió la agregación plaquetaria más del 80% a una dosis acumulativa de 0,35 mg/kg o superior.

25 [0140] El fragmento Fab de OM2 prolongó el tiempo de sangrado cutáneo solo ligeramente (2,4 veces el valor de la línea basal) a una dosis acumulativa de 0,8 mg/kg (Figura 9). Aunque el fragmento Fab de OM2 prolongó ligeramente el tiempo de sangrado a una dosis acumulativa de 18,8 mg/kg, el tiempo de sangrado no superó el tiempo de sangrado observado a 0,8 mg/kg.

30 [0141] En cambio, ReoPro[®] prolongó el tiempo de sangrado cutáneo drásticamente (Figura 9). A una dosis acumulativa de 0,35 mg/kg, el tiempo promedio de sangrado fue 5 veces superior al del valor de la línea basal. Adicionalmente, la prolongación del tiempo de sangrado por ReoPro[®] fue dependiente de la dosis. A una dosis acumulativa de 1,55 mg/kg, el tiempo de sangrado fue 9,5 veces superior que el de la línea basal.

35 [0142] En resumen, el fragmento Fab de OM2 mostró un efecto inhibitor igualmente fuerte sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* que el mostrado por ReoPro[®]. Sin embargo, el efecto del fragmento Fab de OM2 sobre el tiempo de sangrado cutáneo fue mucho más moderado que el de ReoPro[®]. Estos resultados sugieren que el bloqueo de GPVI tiene una proporción riesgo/beneficio superior cuando se compara con la del bloqueo GPIIb/IIIa y por lo tanto puede adaptarse mejor para el tratamiento clínico. Además, en un mono, se observó una mancha roja en el sitio de inyección después de la administración de ReoPro[®] a 0,4 y 0,8 mg/kg. Aunque esta mancha desapareció algunos días después, no se observaron anomalías después de la administración de Fab de OM2.

40 [0143] Estudio farmacodinámico. El cambio en los efectos del fragmento Fab de OM2 a lo largo del tiempo sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* y el tiempo de sangrado cutáneo se evaluó en tres monos *Cynomolgus* después de inyección intravenosa en embolada. El cambio en los efectos por ReoPro[®] se evaluó de manera similar.

45 [0144] Se seleccionó la dosis de 0,4 mg/kg para este estudio porque el fragmento Fab de OM2 y ReoPro[®] inhibían la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* a 0,2 mg/kg y 0,35 mg/kg, respectivamente. Después de la inyección intravenosa en embolada del anticuerpo en la vena cefálica del antebrazo, la sangre se extrajo a 1, 2, 3, 6 y 24 horas. La agregación plaquetaria se midió una 1 hora después de cada extracción de sangre como se ha descrito anteriormente en el estudio de aumento escalonado de la dosis. En este estudio, las concentraciones de colágeno usadas para inducir la agregación plaquetaria fueron de 5 o 10 µg/ml, dependiendo del grado de respuesta de las plaquetas de cada mono. El tiempo de sangrado también se midió 1, 2, 3, 6 y 24 horas después de la administración de anticuerpo, como se describe en el estudio de aumento escalonado de la dosis.

50 [0145] El fragmento Fab de OM2 inyectado a 0,4 mg/kg inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* más del 80% 1, 2, 3 y 6 horas después de la administración (Figura 10). Veinticuatro horas después de la inyección, la agregación plaquetaria recuperó casi el nivel basal.

60 [0146] De manera similar, ReoPro[®] inyectado a 0,4 mg/kg inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* más del 80 % 1 y 2 horas después de la administración (Figura 10). Sin embargo, a diferencia del fragmento Fab de OM2, la agregación plaquetaria se recuperó de una manera dependiente del tiempo: 73% de inhibición 3 horas, 47% de inhibición 6 horas y 6% de inhibición 24 horas después de la administración.

[0147] Como se muestra en la Figura 11, el fragmento Fab de OM2 prolongó ligeramente el tiempo de sangrado cutáneo entre 1 y 6 horas después de la administración (de 1,7 a 2,0 veces más que la línea basal). El tiempo de sangrado regresó casi a un nivel de línea basal 24 horas después de la inyección, coincidiendo con la recuperación de la agregación plaquetaria.

[0148] En cambio, ReoPro® prolongó significativamente el tiempo de sangrado 1 hora después de la administración (10,7 veces más que el nivel de línea basal) (Figura 11). La prolongación del tiempo de sangrado se hizo menos prominente de una manera dependiente del tiempo.

[0149] Estos resultados mostraron que la semivida inhibitoria del fragmento Fab de OM2 sobre la agregación plaquetaria es mayor que la de ReoPro®. Además, estos resultados sugieren de nuevo que la proporción riesgo/beneficio del fragmento Fab de OM2 es superior que la de ReoPro®.

Ejemplo 8

Efecto del fragmento Fab de OM4 sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo*, tiempos de sangrado y recuento de plaquetas en ratas

[0150] Adicionalmente el fragmento Fab OM4 se sometió a ensayo para determinar la agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo*, tiempo de sangrado en la cola y garras en ratas. Para comparar, el fragmento F(ab')₂ de 7E3 derivado de un anticuerpo murino establecido suscitado contra el complejo de glicoproteína plaquetaria humana GPIIb/IIIa (Collar et al. J. Clin Invest. 72: 325-338, 1983) se ensayó de una manera similar. La IgG de 7E3 se obtuvo de grandes cultivos usando un hibridoma 7E3 obtenido de la ATTC. Los fragmentos F(ab')₂ se prepararon como se describe en Collar et al. J. Clin Invest. 72: 325-338, 1983. En estudios preliminares usando ratas, se determinó que la dosis óptima de Fab de OM4 y de F(ab')₂ de 7E3 era de 20 y 10 mg/kg, respectivamente. La agregación plaquetaria inducida por colágeno *ex vivo* permaneció inhibida por Fab de OM4 durante 30 minutos después de los cuales la inhibición se invirtió a los 60-90 minutos, lo que sugiere una rápida eliminación de Fab de OM4 en ratas. Todas las observaciones se realizaron 20 minutos después de la administración de vehículo, compuesto de ensayo y anticuerpo de referencia.

[0151] Ratas adulto macho Sprague-Dawley se anestesiaron con ketamina/xilacina. Catéteres rellenos con heparina se insertaron en la vena femoral, arteria femoral y arteria carótida para la administración del fármaco, registro de presión arterial/frecuencia cardiaca y muestreo de sangre, respectivamente. Después del periodo de equilibrio, se extrajo una pequeña muestra de sangre (~1,2 ml, anticoagulada con 10 U/ml de heparina) de la arteria carótida para la determinación de recuento plaquetario. El grado de agregación plaquetaria provocado por 1 µg/ml de colágeno se midió usando un agregómetro de sangre completa (Chrono-log, Havertown, PA). El tiempo de sangrado de la garra también se determinó en este momento cortando una de las garras de la pata trasera en un punto que cortaba transversalmente la pulpa de la garra y absorbiendo la sangre cada 15 segundos sobre un trozo de papel de filtro, sin tocar el corte superficial de la garra. El tiempo de sangrado de la garra se definió como el tiempo que transcurría entre el corte de la garra y el punto en el cual el papel de filtro ya no absorbía sangre.

[0152] La composición de vehículo, Fab de OM4 o F(ab')₂ de 7E3 se administró en la vena femoral. A los 20 minutos, se extrajo una segunda muestra de sangre para la determinación de la agregometría y recuento plaquetario, como se ha descrito anteriormente. Inmediatamente después de la extracción de la muestra final, se determinaron los tiempos de sangrado de garra y cola. El tiempo de sangrado de la cola se determinó eliminando 3 mm finales de la cola usando una cuchilla de escalpelo afilada y sumergiendo los 2 - 3 cm distales de la cola en solución salina a 37 °C. El tiempo de sangrado en la cola se definió como el tiempo que transcurre entre el corte de la cola y el punto en el cual ya no se extrae mas sangre del corte superficial de la cola. Se usaron seis ratas para cada grupo (vehículo, fragmento Fab de OM4 y F(ab')₂ de 7E3).

[0153] Los fragmentos Fab OM4 y F(ab')₂ de 7E3 produjeron un grado de inhibición de agregación plaquetaria estadísticamente significativo 20 minutos después de la administración de los fragmentos de anticuerpo, en relación con el vehículo (P<0,05) (Figura 12). La inhibición fue muy reproducible, aunque la variabilidad fue ligeramente superior en el grupo Fab de OM4. La presión arterial y la temperatura núcleo corporal permanecieron sin cambios mediante la administración intravenosa de los compuestos vehículo, Fab de OM4, y fragmento F(ab')₂ de 7E3.

[0154] El tiempo de sangrado en la garra se prolongó drásticamente por la administración del fragmento F(ab')₂ de 7E3 mientras que la administración de Fab de OM4 no tuvo efecto en cuatro de seis animales sometidos a ensayo (Fig. 13A). En dos animales, el tiempo de sangrado en la garra se prolongó de 26 a 31 minutos por la administración de Fab de OM4. En cambio, el fragmento F(ab')₂ de 7E3 prolongó el tiempo de sangrado en la garra más allá de 30 minutos y en todos los casos excepto uno en el que el sangrado de la garra se detuvo a los 18 minutos (Fig.13A). El tiempo de sangrado medio en la garra en los animales que recibieron el fragmento F(ab')₂ de 7E3 fue significativamente superior al de los grupos Fab de OM4 y vehículo, como indica el ensayo de la t de Student. Fab de OM4 no indujo ninguna prolongación significativa del tiempo de sangrado de la garra cuando se comparó con el vehículo.

5 [0155] Similar al tiempo de sangrado en la garra, el tiempo de sangrado en la cola se prolongó drásticamente en todos los animales mediante la administración del fragmento $F(ab')_2$ de 7E3 mientras que la administración de Fab de OM4 no tuvo ningún efecto en cuatro de los seis animales sometidos a ensayo (Figura 13B). En dos animales, el tiempo de sangrado en la cola se prolongó a 26 y > 30 minutos. En cambio, el fragmento $F(ab')_2$ de 7E3 prolongó el tiempo de sangrado en la garra más allá de 30 minutos en todos los casos (Figura 13B). No hubo ningún efecto significativo de la administración intravenosa de vehículo, fragmento Fab de OM4 y $F(ab')_2$ de 7E3 sobre el recuento plaquetario (Figura 14).

10 [0156] Los datos obtenidos de este estudio demuestran claramente que el fragmento Fab de OM4 (20 mg/kg) y el fragmento $F(ab')_2$ de 7E3 (10 mg/kg) suscitan grados de inhibición similares de la agregación plaquetaria inducida por colágeno pero $F(ab')_2$ de 7E3 prolongó significativamente el tiempo de sangrado. La capacidad de los fragmentos Fab de OM4 para inhibir la función plaquetaria sin influir significativamente en el tiempo de sangrado sugiere que podría tener beneficio terapéutico. Los Fab de OM4 pueden proporcionar beneficios positivos similares a los de los inhibidores de plaquetas actualmente disponibles sin sus efectos secundarios de sangrado negativos.

15 Ejemplo 9

Efecto del fragmento Fab de OM4 en un modelo de trombosis arterial de rata

20 [0157] El efecto del fragmento Fab de OM4 también se estudió en un modelo de trombosis arterial *in vivo* en ratas. Aunque en la bibliografía se han descrito diversos modelos de trombosis *in vivo*, para ensayar la eficacia de agentes antitrombóticos se ha usado ampliamente un modelo desarrollado por Folts (véase, por ejemplo, Circulation 83 (Suplem. 6): IV 3-14, 1991). Este modelo original se desarrolló en una arteria coronaria canina pero para este estudio, el modelo se modificó para someter a ensayo una arteria carótida de rata. En resumen, la arteria carótida se lesionó mecánicamente, seguido de estenosis. La combinación de lesión vascular y estrechamiento del vaso sanguíneo (dos afecciones que imitan la patogénesis de la trombosis, es decir, arteriosclerosis y estenosis) da como resultado la formación de un trombo. Después, el trombo puede desprenderse mecánicamente y volverse a formar por eliminación y sustitución del ocluidor vascular, respectivamente. Esto conduce a una reducción de flujo cíclico (RFC) como se describe con más detalle a continuación. Los agentes antitrombóticos pueden reducir el número de RFC o impedir completamente la formación de RFC.

35 [0158] Las ratas se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) y se oxigenaron mecánicamente con una intubación de la tráquea. Se diseccionó un segmento de la vena femoral y se usó para inyección del fármaco. La arteria carótida se expuso mediante una incisión media en el área cervical ventral y se diseccionó sin tejido conectivo. Se colocó una pequeña sonda de flujo (Transonic, 1RB, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) distalmente sobre la arteria para medir el flujo de sangre. La trombosis se indujo aplicando dos condiciones. En primer lugar, se indujo una lesión mediante tres pinzamientos cruzados consecutivos de la mitad del segmento expuesto de la arteria durante 10 segundos cada uno, con un soporte de aguja que tenía un trinquete de cierre en clic. En segundo lugar, se aplicó una reducción del 50% del flujo sanguíneo de la línea basal inflando un ocluidor vascular (1,5 mm de diámetro interno, In Vivo Metric, Healdsburg, CA), que consistía en un globo en forma de C que se colocó en el lugar de la lesión. El flujo sanguíneo se redujo gradualmente a cero aproximadamente a los 2-5 minutos debido a la formación de un trombo. El trombo se desprendió físicamente desinflando el globo y el flujo sanguíneo se restauró inmediatamente. Se contó una RFC cuando el flujo sanguíneo se redujo a cero después de reducción del flujo sanguíneo al 50% y cuando el flujo sanguíneo se restauró. Después de re-aplicar la reducción de flujo al 50%, el flujo sanguíneo de nuevo disminuyó gradualmente, dando como resultado el siguiente CFR como un nuevo trombo formado. Durante un periodo de observación de 30 minutos se contó el número de RFC. El número también se redondeó a la mitad de un ciclo.

50 [0159] En los grupos pre-lesionados, se proporcionó bien solución salina o fragmento Fab de OM4 a 20 mg/kg mediante una inyección intravenosa en embolada 2 minutos antes de aplicar la lesión mecánica. Después se registraron las CFR durante 30 minutos.

[0160] En los grupos post-lesionados, las RFC se iniciaron por lesión endotelial y una reducción de flujo del 50%. Las RFC se observaron durante 15 minutos seguido de una inyección intravenosa en embolada de vehículo o fragmento Fab de OM4 a 20 mg/kg. Después, las RFC se registraron durante 30 minutos.

55 [0161] Se usó un ensayo de t de Student para muestras no relacionadas para comparar el número de RFC en solución salina y en los grupos pre o post-tratados con OM4. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

60 [0162] Grupos pre-lesionados. El fragmento Fab de OM4 inyectado a 20 mg/kg antes de lesión mecánica redujo el número de RFC de $10,5 \pm 4,1$ (media \pm DT) a $4,1 \pm 5,2$ (Figura 15A). Esta reducción fue estadísticamente significativa ($p < 0,02$, ensayo de t).

[0163] Grupos post-lesionados. El fragmento Fab de OM4 inyectado a 20 mg/kg después del establecimiento de CFR también redujo el número de RFC de $12,2 \pm 3,8$ a $3,5 \pm 3,6$ (Figura 15B). Esta reducción también fue estadísticamente

significativa ($p < 0,003$, ensayo de t). Este resultado demuestra que el fragmento Fab de OM4 puede inhibir la formación de trombo incluso después de iniciar la interacción entre las plaquetas y el colágeno subendotelial. Además, estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-GPVI pueden posiblemente inhibir la formación de trombosis arterial *in vivo* inducida por perturbación de flujo sanguíneo/lesión endotelial que, en situaciones clínicas, son desencadenantes de enfermedades trombóticas propuestas.

Ejemplo 10

Relación entre la tasa de ocupación de GPVI y la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno

[0164] Se examinó la relación entre la tasa de ocupación de GPVI sobre la superficie de las plaquetas y el efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno por el fragmento Fab de OM2 biotinilado en plaquetas humanas *in vivo*.

[0165] El fragmento Fab de OM2 se biotiniló con Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce). La solución de biotina (150 μ l, 10 mg/ml en agua destilada) se añadió a la solución del fragmento Fab de OM2 en PBS (5 mg, 2 mg/ml). El tubo de la reacción se incubó en hielo durante 2 horas. Para eliminar la biotina libre, la mezcla de reacción se dializó con solución salina en una sala fría durante una noche.

[0166] Se extrajo sangre de 3 donantes sanos en un volumen 1/10 de anticoagulante citrato trisódico al 3,8% y se obtuvo un plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 180 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Las plaquetas se contaron y se ajustaron a 3×10^8 plaquetas/ml con plasma pobre en plaquetas. La medición de la agregación se realizó a las 4 horas de la extracción de la sangre. Los estudios de agregación se realizaron en un agregómetro AG10 (Kowa, Japón). El PRP se incubó con el fragmento Fab de OM2 biotinilado (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,3, 10 y 20 μ g/ml) durante 10 minutos a 37 °C antes de añadir el colágeno y la agregación se controló durante 5-10 minutos más. La dosis de colágeno requerida para inducir un 70-90% de agregación se determinó para cada donante antes de la evaluación del anticuerpo.

[0167] El PRP (3×10^8 plaquetas/ml, 400 μ l cada uno) se incubó con el fragmento Fab de OM2 biotinilado (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 3, 10 y 20 μ g/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las plaquetas lavadas se prepararon de la siguiente manera. El PRP se complementó con PGE₁ 1 μ g/ml, EDTA y EGTA 1 mM y se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos. Después desechar el plasma, el sedimento plaquetario se suspendió en tampón de lavado plaquetario (PWB: solución salina tamponada con fosfato complementada con EDTA y EGTA 1 mM, NaN₃ al 0,1%, PGE₁ 100 ng/ml y BSA al 0,35%, pH 7,4). Después, las plaquetas se centrifugaron y se lavaron de nuevo. Las plaquetas lavadas se suspendieron en un pequeño volumen de PWB y las plaquetas se contaron. Finalmente, las plaquetas lavadas (1×10^8 plaquetas/ml) se disolvieron mezclando con un volumen igual de Triton X-100 al 1% que contenía solución salina tamponada con fosfato.

[0168] El fragmento Fab de OM2 biotinilado se cuantificó por el método ELISA usando, como reactivo de captura, estreptavidina (Pierce, 21125) y como reactivo detector, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (American, Qualex, A106PU).

[0169] En los tres donantes, el fragmento Fab de OM2 biotinilado inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno más del 75% a una concentración de 3 μ g/ml.

[0170] En el ensayo de tasa de ocupación, se supuso que la tasa de ocupación era al 100% a 20 μ g/ml del fragmento Fab de OM2 biotinilado (cantidad unidad: $26,4 \pm 5,5$ ng/ 5×10^7 plaquetas). Como se muestra en la Figura 16, la cantidad de fragmento Fab de OM2 unida se saturó a 3 μ g/ml ($24,3 \pm 3,5$ ng/ 5×10^7 plaquetas). La tasa de ocupación del fragmento Fab de OM2 biotinilado a 3 μ g/ml fue del 92%. Este resultado sugiere que se necesita una tasa de ocupación de más del 90% de GPVI sobre la superficie plaquetaria para ejercer un efecto inhibitorio máximo sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno.

[0171] Como conclusión, los anticuerpos de la presente invención específicos contra GPVI pueden ser agentes antitrombótico útiles. Como se ha demostrado anteriormente, los anticuerpos específicos contra GPVI son fuertes inhibidores de las funciones plaquetarias inducidas por colágeno.

[0172] La memoria descriptiva se entenderá más detalladamente a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva. Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la realización práctica de la presente descripción descrita en este documento

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido, péptido, o variante que se encuentra de manera natural, de GPVI seleccionado de OM1, OM2, OM3 y OM4
- en el que dicho OM1 comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) caracterizadas por las SEC ID Nos: 1-3 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 4-6 en una segunda cadena de anticuerpo;
- 10 en el que dicho OM2 comprende tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 7-9 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 10-12 en una segunda cadena de anticuerpo;
- en el que dicho OM3 comprende tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 13-15 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 16-18 en una segunda cadena de anticuerpo;
- 15 en el que dicho OM4 comprende tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 19-21 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por la SEC ID Nos: 22-24 en una segunda cadena de anticuerpo.
- 20 2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado de los hibridomas que tienen los números de acceso PTA-5938, PTA-5939, PTA-5940 y PTA-5941 de la ATCC.
- 25 3. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para un polipéptido, péptido, o una variante que e encuentra de manera natural, de GPVI, seleccionado de OM1 humanizado, OM2 humanizado, OM3 humanizado y OM4 humanizado,
- en el que dicho OM1 humanizado comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) caracterizadas por las SEC ID Nos: 1-3 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 4-6 en una segunda cadena de anticuerpo;
- 30 en el que dicho OM2 humanizado comprende tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 7-9 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nº: 10-12 en una segunda cadena de anticuerpo;
- en el que dicho OM3 humanizado comprende tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 13-15 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 16-18 en una segunda cadena de anticuerpo;
- 35 en el que dicho OM4 humanizado comprende tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 19-21 en una primera cadena de anticuerpo y tres CDR caracterizadas por las SEC ID Nos: 22-24 en una segunda cadena de anticuerpo.
- 40 4. Un hibridoma seleccionado de los hibridomas que tienen los números de acceso PTA-5938, PTA-5939, PTA-5940 y PTA-5941 de la ATCC
- 45 5. Una composición antitrombótica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
6. Un método para preparar una composición antitrombótica que comprende mezclar al menos un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 7. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad vascular en un paciente, en el que el tratamiento inhibe la trombosis.
8. La composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad vascular en un paciente, en el que el tratamiento inhibe la trombosis.
- 55 9. Un kit que comprende, en un envase, al menos una dosis de una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.

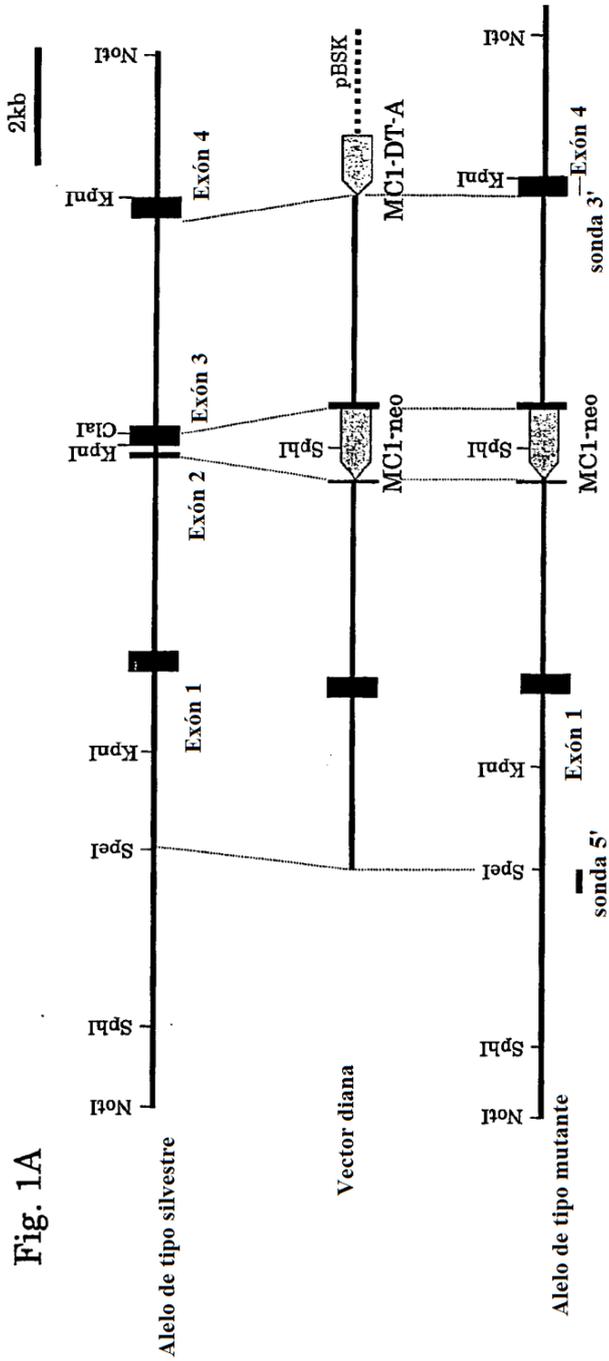


Fig. 1A

Fig. 1B

	Alelo de tipo silvestre	Alelo de tipo mutante
sonda 5' / SphI:	13,3 kb	10,1 kb
sonda 3' / KpnI:	4,0 kb	9,8 kb

Figura 1

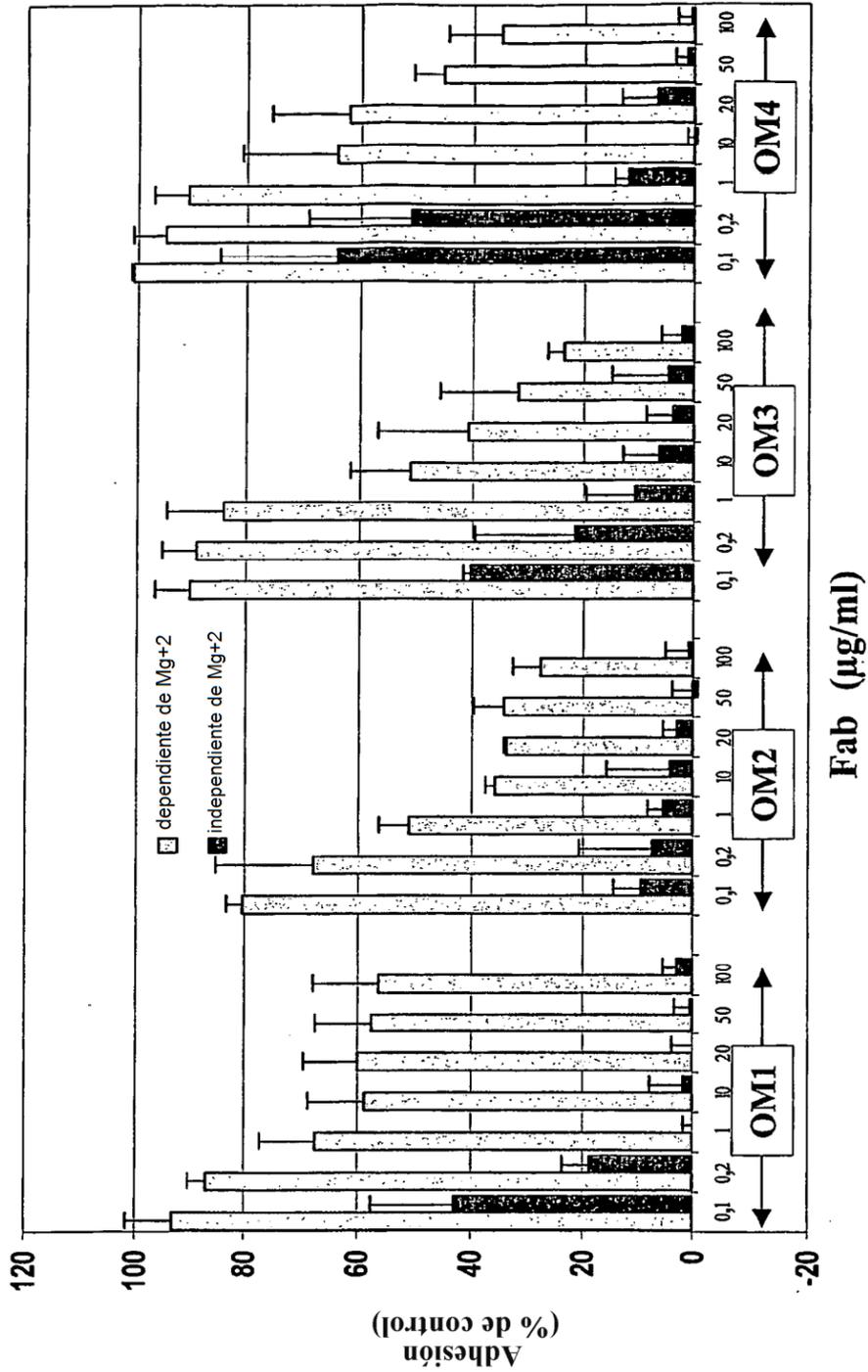


Figura 2

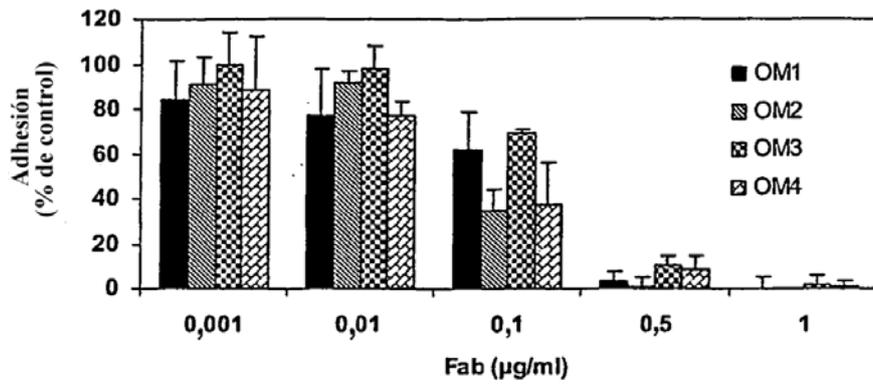


Figura 3

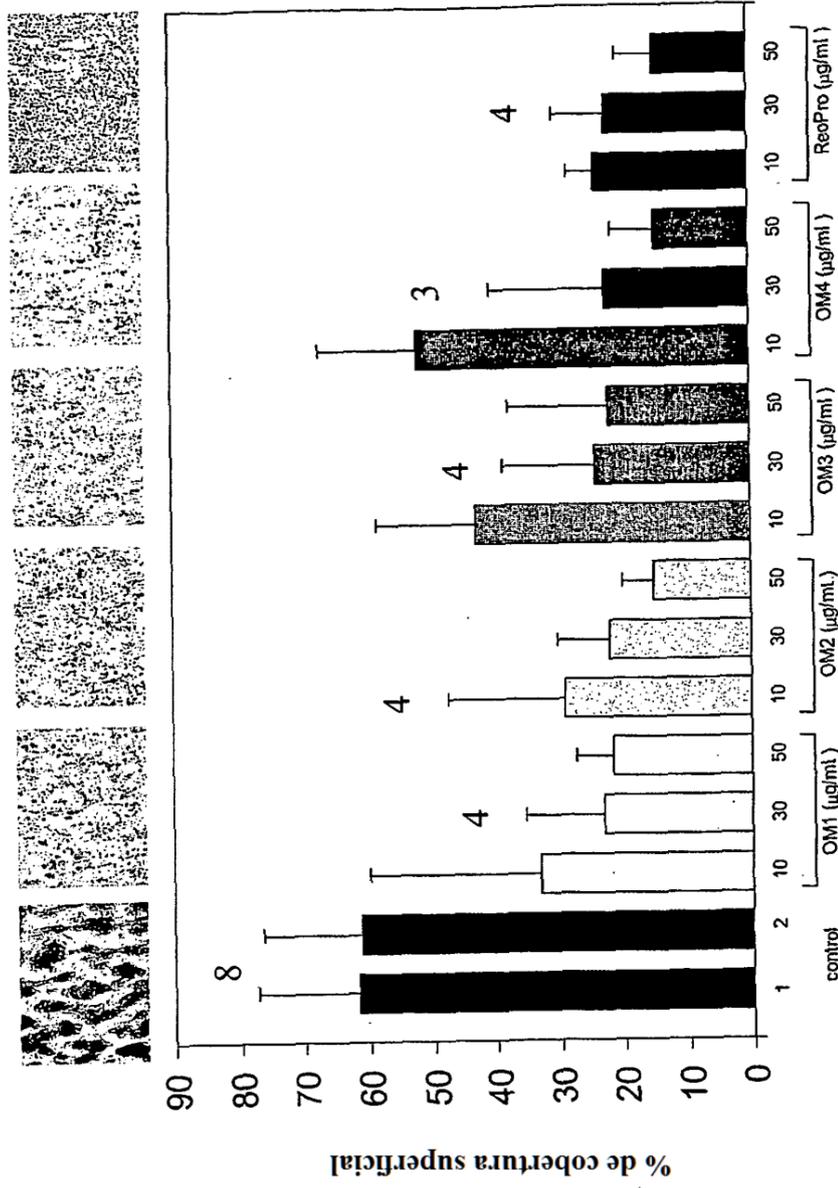


Figura 4

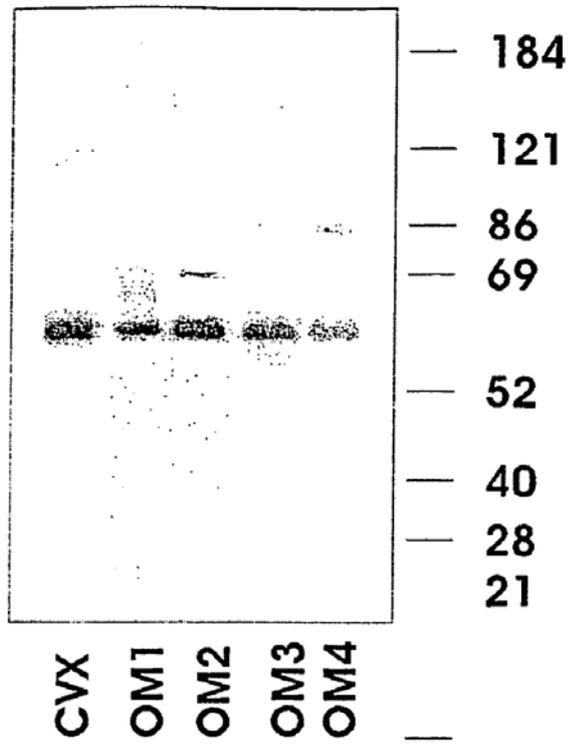


Figura 5

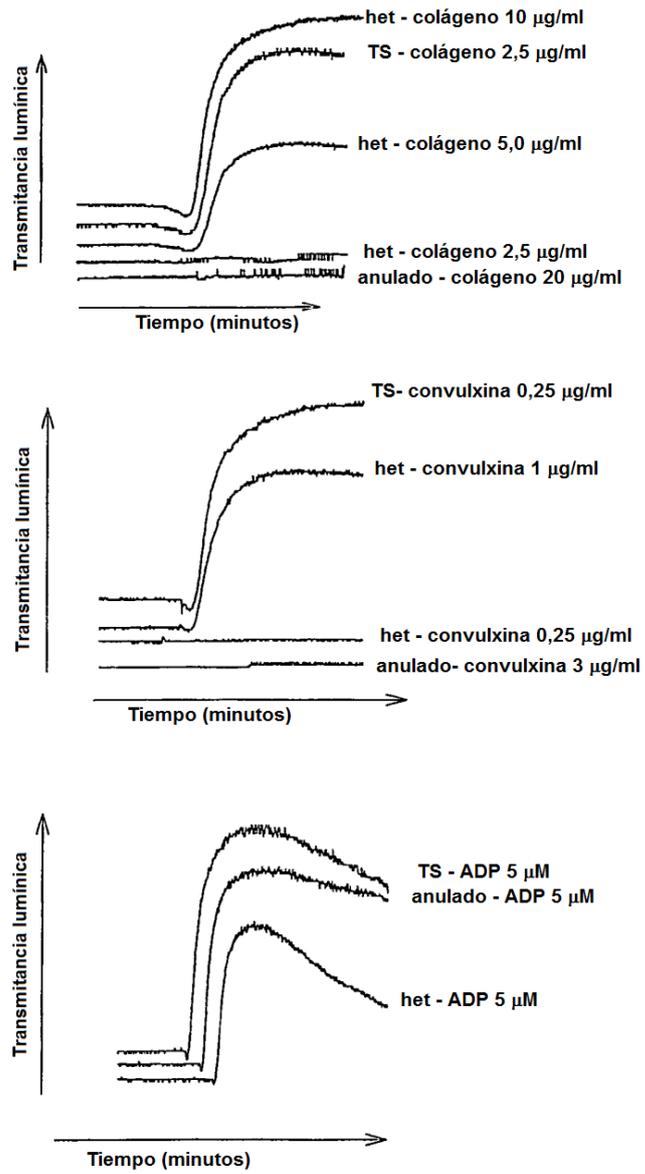


Figura 6

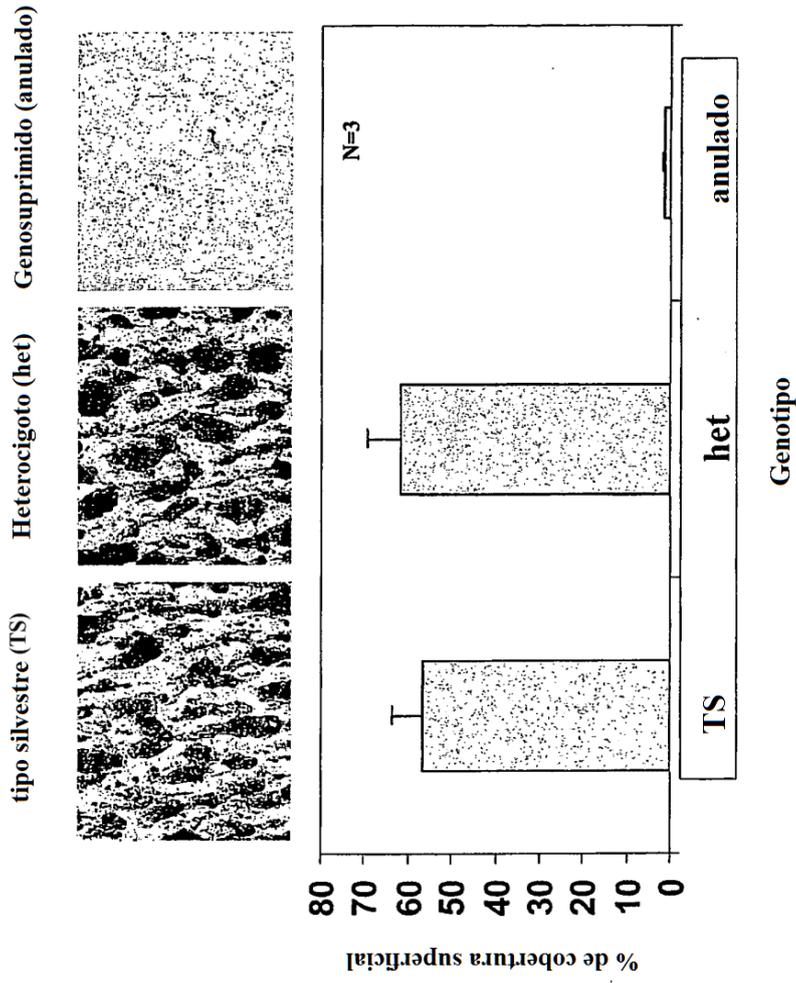


Figura 7

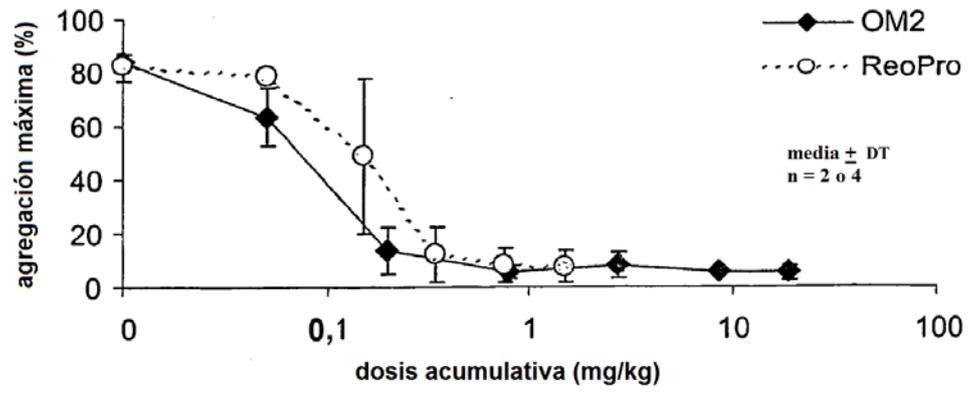


FIGURA 8

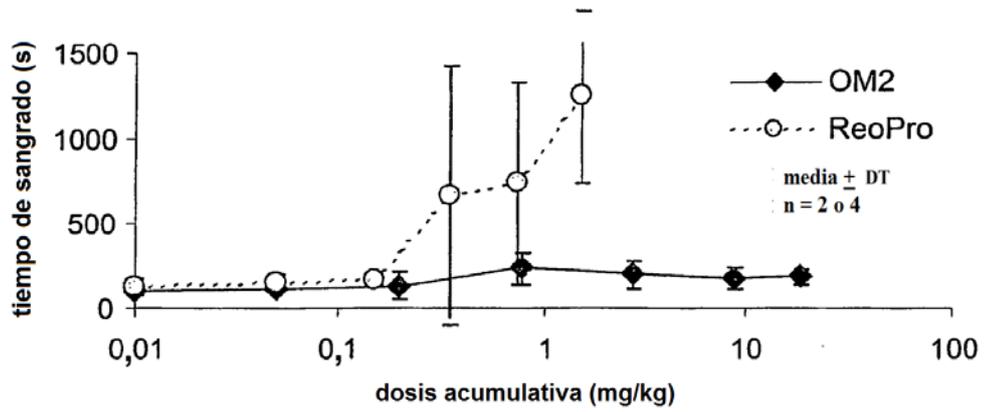


FIGURA 9

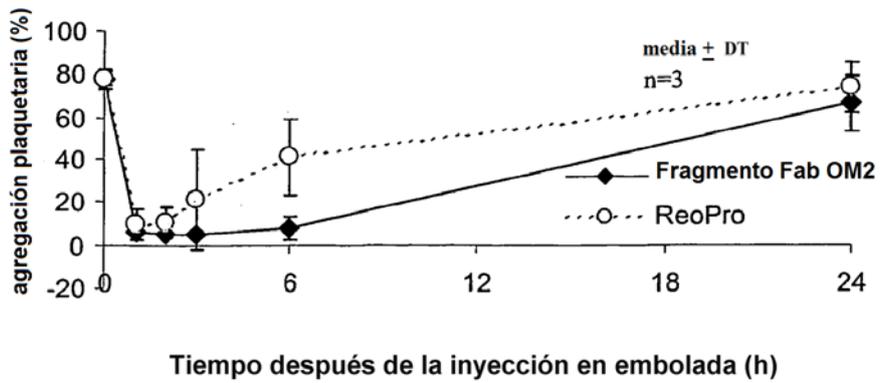


FIGURA 10

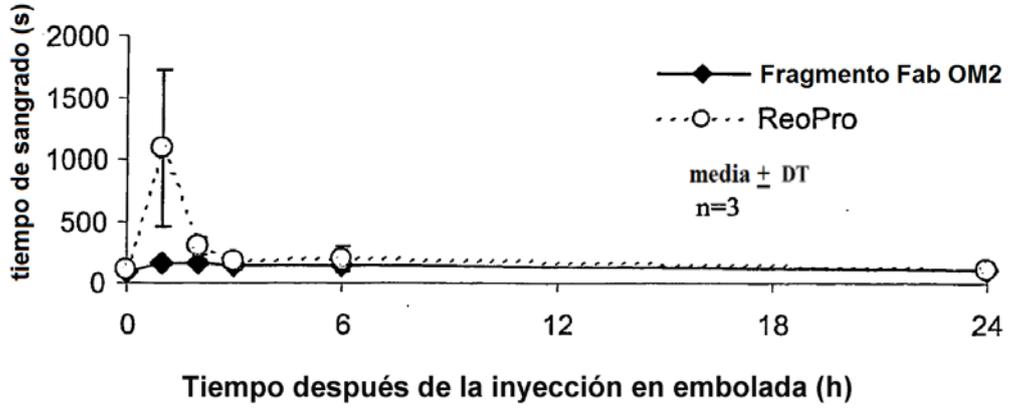


FIGURA 11

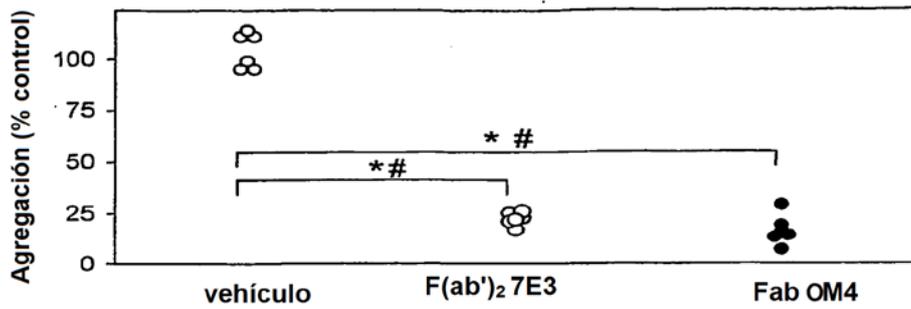


Figura 12

Figura 13

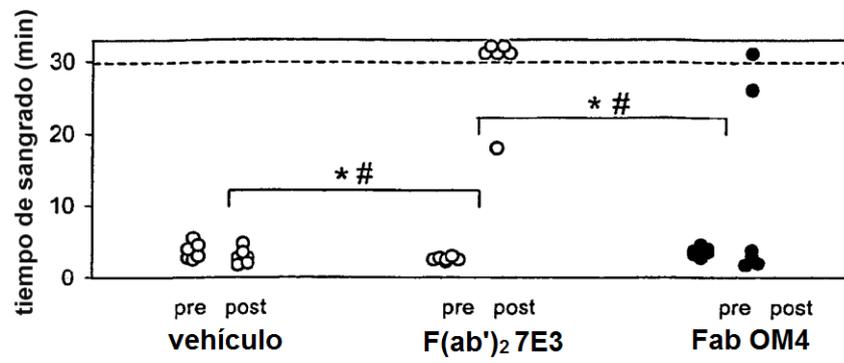


Figura 13A

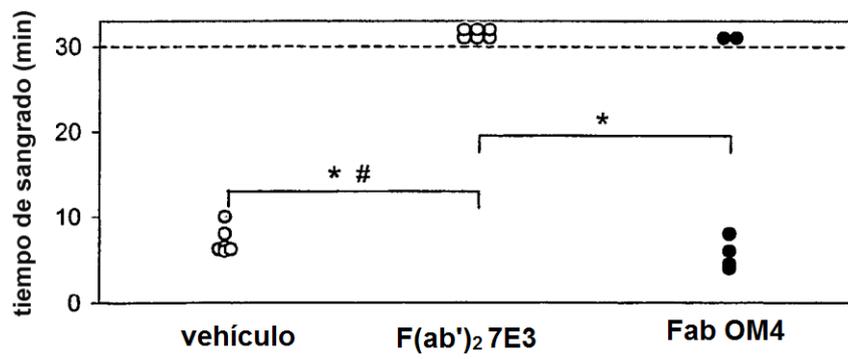


Figura 13B

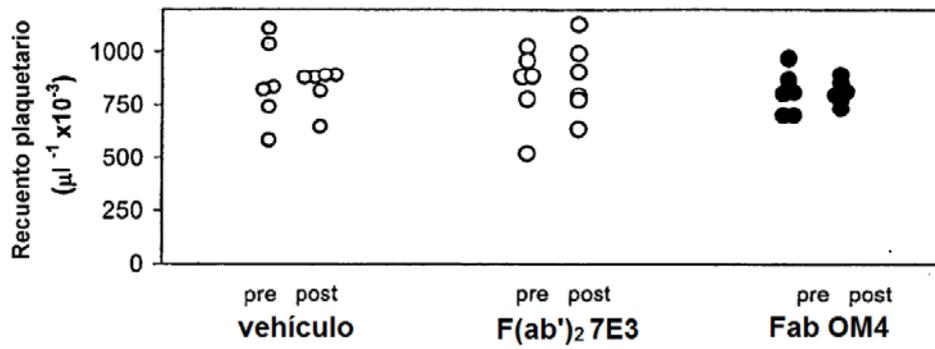


Figura 14

Figura 15

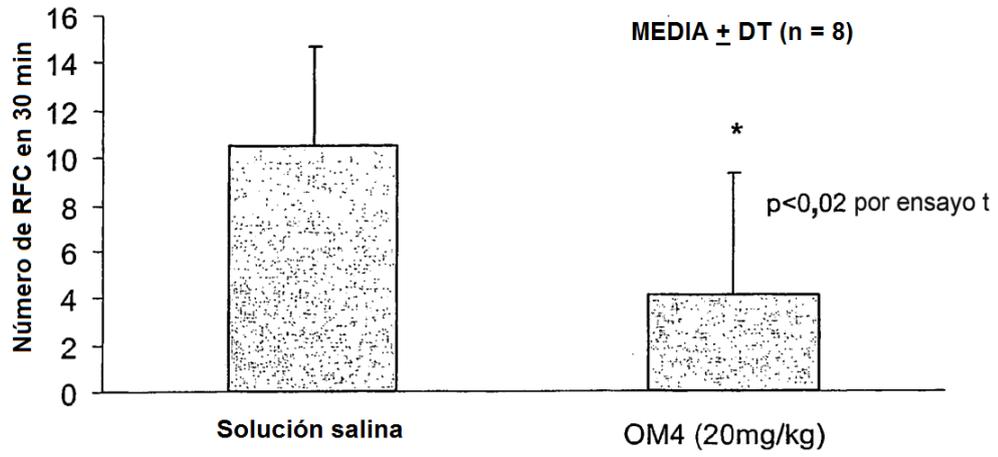


Figura 15A

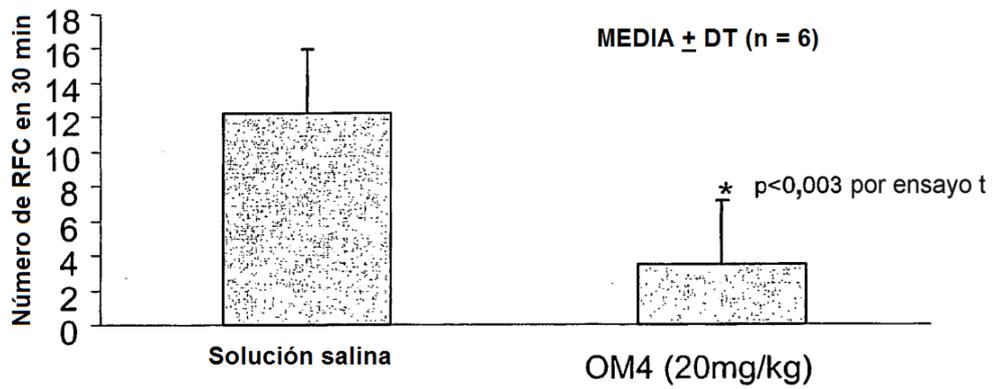


Figura 15B

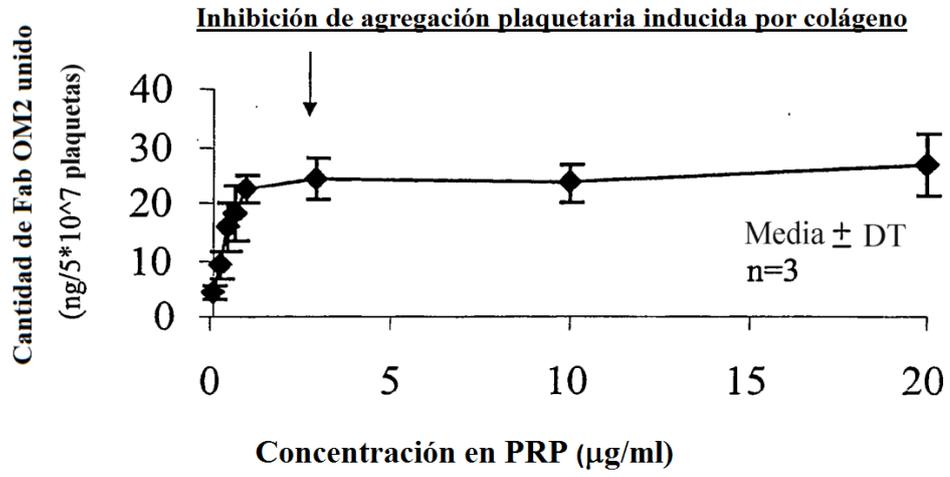


Figura 16

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 56617104 P [0001]
- WO 0068377 A [0015]
- US 20030186885 A [0049] [0091]
- US 5506559 A [0050]
- US 20030186885 A1 [0052]
- US 4376110 A [0053]
- US 4486530 A [0053]
- US RE32011 E [0054]
- US 4902614 A [0054]
- US 4543439 A [0054]
- US 4411993 A [0054]
- US 4470925 A [0058]
- US 5506342 A, Reno [0059]
- US 5705154 A, Dalie [0065]
- US 5693322 A, Creekmore [0065]
- US 5677180 A, Robinson [0065]
- US 5646253 A, Wallace [0065]
- US 5585097 A, Bolt [0065]
- US 5631349 A, Diamantstein [0065]
- US 5580774 A, Beavers [0065]
- US 5585089 A, Queen [0065]
- US 5686571 A [0070]
- US 20020141992 A [0103] [0115]
- WO 03054020 A [0103] [0117]
- WO 0100810 A [0103] [0116]
- WO 02080968 A [0103] [0125]
- WO 0280968 A [0114] [0116]
- US 20040253236 A [0114]
- US 6245527 B [0117]
- US 6383779 B [0117]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- Mechanisms of Platelet Activation and Control. Plenum Press, 1993 [0003]
- RUGGERI. *Nature Medicine*, 2002, vol. 8, 1227-1234 [0004] [0006]
- BAUMGARTNER. *Thromb Haemost.*, 1977, vol. 37, 1-16 [0005]
- NIESWANDT B ; WATSON SP. *Blood*, 2003, vol. 102, 449-461 [0007]
- FARNDAL RW et al. *J Thromb. Haemost.*, 2004, vol. 2, 561-573 [0008]
- NAKAMURA et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 4338-4344 [0010]
- SUGIYAMA et al. *Blood*, 1987, vol. 69, 1712-20 [0011] [0012]
- MOROI et al. *J. Clin. Invest.*, 1989, vol. 84, 1440-45 [0011]
- RYO et al. *Am. J. Hematol.*, 1992, vol. 39, 25-31 [0011]
- ARAI et al. *Brit. J. Haematol.*, 1995, vol. 89, 124-130 [0011]
- FRANCISHETTI et al. *Toxicon*, 1997, vol. 35, 1217-28 [0014]
- POLGARET. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (24), 13576-83 [0014]
- JANDROT-PERRUS et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (2), 27035-41 [0014]
- CLEMETSON et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 29019-24 [0015]
- JANDROT-PERRUS et al. *Blood*, 2000, vol. 96, 1798-807 [0015]
- EZUMI et al. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, vol. 277, 27-36 [0015]
- GIBBINS et al. *FEBS Lett.*, 1997, vol. 413, 255-259 [0015]
- TSUJI et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 23528-23531 [0015]
- CLEMETSON et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 29019-290 [0015]
- JANDROT-PERRUS et al. *Blood*, 2000, vol. 96, 1798-1807 [0015]
- SUGIYAMA et al. *Blood*, 1987, vol. 69, 1712-1720 [0016]
- MOROI et al. *J. Clin. Invest.*, 1989, vol. 84, 1140-1445 [0016]
- ARAI et al. *Br. J. Haematol.*, 1995, vol. 89, 124-130 [0016]
- GOTO et al. *Circulation*, 2002, vol. 106, 266-272 [0016]
- NIESWANDT et al. *The EMBO Journal*, 2001, vol. 20, 2120-2130 [0017]
- KATO et al. *Blood*, 2003, vol. 102, 1701-1707 [0017]
- ICHINOHE. *J. Biol Chem.*, 1995, vol. 270 (47), 28029-28036 [0018]
- TSUJI et al. *J. Biol Chem.*, 1997, vol. 272 (28), 23528-31 [0018]
- NIESWANDT ; WATSON. *Blood*, 2003, vol. 102, 449-461 [0018]
- MOTULSKY. *Analyzing Data with GraphPad Prism*. GraphPad Software Inc, 1999 [0049]

- **SCATCHARD et al.** *Ann. NY Acad. Sci.*, 1949, vol. 51, 115-122 [0065]
- **SUN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 214-218 [0065]
- 5 • **QUEEN et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 10029-33 [0065]
- **RADER et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 8910-8915 [0066]
- 10 • **STEINBERGER et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 36073-36078 [0066]
- **SON et al.** *J. Immunol Methods*, 2004, vol. 286, 187-201 [0066]
- 15 • **LEE et al.** *J. Immunother.*, 2004, vol. 27, 201-210 [0066]
- **FUJIMURA et al.** *Thromb. Haemost.*, 2002, vol. 87, 728-734 [0068]
- **DEVEREUX et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 387 [0068]
- 20 • **NEEDLEMAN ; WUNSCH.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0068]
- **SMITH ; WATERMAN.** *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0068]
- 25 • **GRIBSKOV ; BURGESS.** *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 6745 [0068]
- Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, 1979, 353-358 [0068]
- 30 • **DIAZ-RICART et al.** *Blood*, 1993, vol. 82, 491-496 [0070]
- **BROWN ; LARSON.** *BMC Immunology*, 2001, vol. 2, 9-15 [0070]
- 35 • **MATSUNO et al.** *British J. Haematology*, 1996, vol. 92, 960-967 [0070]
- **NAKAMURA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273 (8), 4338-44 [0070] [0104]
- 40 • **TANDON et al.** *Br. J. Haematol.*, 1995, vol. 89, 124-30 [0072]
- **SUN et al.** *J. Cardiovascular Pharmacol.*, 2002, vol. 40, 557-585 [0074]
- **DIAZ-RICART.** *Arteriosclerosis, Thromb. Vasc. Biol.*, 1996, vol. 16, 883-888 [0075]
- 45 • **COLLER ; SCUDDER.** *Blood*, 1985, vol. 66, 1456-59 [0076]
- **COLLER et al.** *Blood*, 1986, vol. 68, 783-86 [0076]
- **COLLER et al.** *Circulation*, 1989, vol. 80, 1766-74 [0076]
- 50 • **COLLER et al.** *Ann. Intern. Med.*, 1988, vol. 109, 635-38 [0076]
- **GOLD et al.** *Circulation*, 1988, vol. 77, 670-77 [0076]
- **MICKELSON et al.** *J. Molec. Cell Cardiol.*, 1989, vol. 21, 393-405 [0076]
- 55 • Laboratory Press, 1988 [0053] [0058]
- Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses. Plenum Press, 1980 [0054]
- 60 • **ALTING-MEES et al.** Monoclonal Antibody Expression: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, 1992
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Mack Publishing Co, 2000 [0080]
- **KHANDURINA et al.** *Curr Opin Chem Biol.*, 2002, vol. 6, 359-66 [0086]
- **KUMBLE.** *Anal Bioanal Chem.*, 2003, vol. 377, 812-819 [0086]
- **BLEICHER et al.** *Nature Rev Drug Disc*, 2003, vol. 2, 369-378 [0086]
- **MORI.** *Neurosci. Res.*, 2002, vol. 43, 251-7 [0090]
- **EZUMI Y. et al.** *Biochem Biophys Res Comm*, 2000, vol. 277, 27-36 [0090]
- **PARHAM et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1982, vol. 53, 133-173 [0098]
- **NIESWANDT.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 23998-24002 [0103] [0115]
- **LECUT et al.** *J. Thrombosis and Haemostasis*, 2003, vol. 1, 2653-2662 [0103]
- **MOROI et al.** *Thromb. Haemost.*, 2003, vol. 89, 996-1003 [0103]
- **SMETHURST et al.** *Blood*, 2004, vol. 103, 903-911 [0103] [0117] [0125]
- **QIAN et al.** *Human Antibodies*, 2002, vol. 11, 97-105 [0103] [0116]
- **NAKAMURA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 4338-4334 [0105]
- **COLLER ; SCUDDER.** *Blood*, 1985, vol. 66, 1456-1459 [0109]
- **LUCET et al.** *J. Thrombosis and Haemostasis*, 2003, vol. 1, 2653-2662 [0114]
- **TAKAYAMA et al.** *J. Thrombosis and Hemostasis*, 2003, vol. 14, 75-81 [0115]
- **NAKAMURA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 4338 [0122]
- **NAKAMURA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 11879 [0122]
- **FUJIMURA et al.** *Thromb Haemost*, 2002, vol. 87, 728-34 [0123]
- **SASSOLI et al.** *Thromb Haemost*, 2001, vol. 85, 868-902 [0125]
- **SMETHURST et al.** *Blood*, 2004, vol. 103, 903-91 [0125]
- **NIESWANDT.** *The EMBO Journal*, 2001, vol. 20, 2120-2130 [0131]
- **KAIRBAAN et al.** *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 229-238 [0134]
- *J Clin Invest*, 1999, vol. 103, 229 [0134]
- **COLLAR et al.** *J. Clin Invest.*, 1983, vol. 72, 325-338 [0150]
- *Circulation*, 1991, vol. 83 (6), IV 3-14 [0157]
- 'Best Fit' Framework Selection and Recombinant Polymerase Chain Reaction. **A. LEWIS ; J. CROWE.** Generation of Antibodies by Cell and Gene Immobilization. Year Immunol. 1993, vol. 7, 110-118 [0063]
- **LATHE et al.** *J. Mol. Biol.*, 1985, vol. 183, 1-12 [0064]

- SUN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 214-218 [0065]
- QUEEN et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 10029-33 [0065]
- RADER et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 8910-8915 [0066]
- STEINBERGER et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 36073-36078 [0066]
- SON et al. *J. Immunol. Methods*, 2004, vol. 286, 187-201 [0066]
- LEE et al. *J. Immunother.*, 2004, vol. 27, 201-210 [0066]
- FUJIMURA et al. *Thromb. Haemost.*, 2002, vol. 87, 728-734 [0068]
- DEVEREUX et al. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 387 [0068]
- NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0068]
- SMITH ; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0068]
- GRIBSKOV ; BURGESS. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 6745 [0068]
- Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, 1979, 353-358 [0068]
- DIAZ-RICART et al. *Blood*, 1993, vol. 82, 491-496 [0070]
- BROWN ; LARSON. *BMC Immunology*, 2001, vol. 2, 9-15 [0070]
- MATSUNO et al. *British J. Haematology*, 1996, vol. 92, 960-967 [0070]
- NAKAMURA et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273 (8), 4338-44 [0070] [0104]
- TANDON et al. *Br. J. Haematol.*, 1995, vol. 89, 124-30 [0072]
- SUN et al. *J. Cardiovascular Pharmacol.*, 2002, vol. 40, 557-585 [0074]
- DIAZ-RICART. *Arteriosclerosis, Thromb. Vasc. Biol.*, 1996, vol. 16, 883-888 [0075]
- COLLIER ; SCUDDER. *Blood*, 1985, vol. 66, 1456-59 [0076]
- COLLIER et al. *Blood*, 1986, vol. 68, 783-86 [0076]
- COLLIER et al. *Circulation*, 1989, vol. 80, 1766-74 [0076]
- COLLIER et al. *Ann. Intern. Med.*, 1988, vol. 109, 635-38 [0076]
- GOLD et al. *Circulation*, 1988, vol. 77, 670-77 [0076]
- MICKELSON et al. *J. Molec. Cell Cardiol.*, 1989, vol. 21, 393-405 [0076]
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Mack Publishing Co, 2000 [0080]
- KHANDURINA et al. *Curr Opin Chem Biol.*, 2002, vol. 6, 359-66 [0086]
- KUMBLE. *Anal Bioanal Chem.*, 2003, vol. 377, 812-819 [0086]
- BLEICHER et al. *Nature Rev Drug Disc*, 2003, vol. 2, 369-378 [0086]
- MORI. *Neurosci. Res.*, 2002, vol. 43, 251-7 [0090]
- EZUMI Y. et al. *Biochem Biophys Res Comm*, 2000, vol. 277, 27-36 [0090]
- PARHAM et al. *J. Immunol. Meth.*, 1982, vol. 53, 133-173 [0098]
- NIESWANDT. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 23998-24002 [0103] [0115]
- LECUT et al. *J. Thrombosis and Haemostasis*, 2003, vol. 1, 2653-2662 [0103]
- MOROI et al. *Thromb. Haemost.*, 2003, vol. 89, 996-1003 [0103]
- SMETHURST et al. *Blood*, 2004, vol. 103, 903-911 [0103] [0117] [0125]
- QIAN et al. *Human Antibodies*, 2002, vol. 11, 97-105 [0103] [0116]
- NAKAMURA et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 4338-4334 [0105]
- COLLIER ; SCUDDER. *Blood*, 1985, vol. 66, 1456-1459 [0109]
- LUCET et al. *J. Thrombosis and Haemostasis*, 2003, vol. 1, 2653-2662 [0114]
- TAKAYAMA et al. *J. Thrombosis and Hemostasis*, 2003, vol. 14, 75-81 [0115]
- NAKAMURA et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 4338 [0122]
- NAKAMURA et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 11879 [0122]
- FUJIMURA et al. *Thromb Haemost*, 2002, vol. 87, 728-34 [0123]
- SASSOLI et al. *Thromb Haemost*, 2001, vol. 85, 868-902 [0125]
- SMETHURST et al. *Blood*, 2004, vol. 103, 903-91 [0125]
- NIESWANDT. *The EMBO Journal*, 2001, vol. 20, 2120-2130 [0131]
- KAIRBAAN et al. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 229-238 [0134]
- *J Clin Invest*, 1999, vol. 103, 229 [0134]
- COLLAR et al. *J. Clin Invest.*, 1983, vol. 72, 325-338 [0150]
- *Circulation*, 1991, vol. 83 (6), IV 3-14 [0157]