

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 170**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004 E 04812819 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1694349**

54 Título: **Anticuerpos y péptidos específicos de la integrina alfa II beta3**

30 Prioridad:

03.12.2003 US 526859 P

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

27.12.2013

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**BARBAS, CARLOS, F. y
CHUNG, JENHO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 170 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 y péptidos específicos de la integrina alfa II beta3

Campo técnico de la invención

5 El campo técnico de la presente invención es la agregación plaquetaria. Más en concreto, la presente invención se refiere a anticuerpos y péptidos específicos de integrina, y al uso de estos compuestos para inhibir la agregación plaquetaria.

Antecedentes de la invención

10 Los inhibidores de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ son una nueva clase de agente antitrombóticos que inhiben la unión del fibrinógeno a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, inhibiendo con ello las interacciones entre plaquetas, fundamentales para la formación de trombos plaquetarios (Topol, E. J., Byzova, T. V, y Plow, E. F. (1999), Platelet GPIIb-IIIa blockers, Lancet, 353, 227-231; Collier, B. S. (1997), Platelet GPIIb/ IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics, J. Clin. Invest., 99, 1467-1471). Los inhibidores de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se emplean para el tratamiento de pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST y pacientes sometidos a una intervención coronaria percutánea (Proimos, G. (2001), Platelet aggregation inhibition with glycoprotein IIb-IIIa inhibitors, J. Thromb. Thrombolysis, 11, 99-110). Entre estos inhibidores, el elabciximab (ReoPro, Centocor, Inc., Malvern, Pensilvania, y Eli Lilly & Company, Indianápolis, Indiana) (Collier, B. S. (1997), Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics, J. Clin. Invest., 99, 1467-1471), la eptifibatida (INTEGRILIN, COR Therapeutics, Inc., South San Francisco, California, y Key Pharmaceuticals, Inc., Kenilworth, Nueva Jersey) (Phillips, D. R., y Scarborough, R. M. (1997), Clinical pharmacology of eptifibatide, Am. J. Cardiol., 80, 11B-20B; Scarborough, R. M. (1999), Development of eptifibatide, Am. Heart. J., 138, 1093-1104), y el tirofiban (Aggrastat, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey) (Vickers, S., Theoharides, A. D., Arison, B., Balani, S. K., Cui, D., Duncan, C. A., Ellis, J. D., Gorham, L. M., Polsky, S. L., Prueksaritanont, T., Ramjit, H. G., Slaughter, D. E., y Vyas, K. P. (1999), In vitro and in vivo studies on the metabolism of tirofiban, Drug Metab. Dispos., 27, 1360-1366) están aprobados clínicamente en EEUU. El abciximab, el primer agente aprobado y el más ampliamente utilizado, es un Fab quimérico con dominios variables de ratón y dominios constantes humanos. Se une a un epitopo adyacente a la región de unión del ligando e inhibe la unión del fibrinógeno mediante impedimento estérico. Se ha divulgado que el abciximab presenta reacción cruzada con la integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_M\beta_2$ (Scarborough, R. M. (1999), Development of eptifibatide, Am. Heart J., 138, 1093-1104). La eptifibatida y el tirofiban, por otra parte, son fármacos de molécula pequeña que se unen al sitio de interacción con el ligando RGD de la integrina y son específicos de $\alpha_{IIb}\beta_3$. Muestran menor afinidad y unas semividas en la circulación mucho más cortas que el abciximab (Scarborough, R. M. (1999), Development of eptifibatide, Am. Heart. J., 138, 1093-1104; Vickers, S., Theoharides, A. D., Arison, B., Balani, S. K., Cui, D., Duncan, C. A., Ellis, J. D., Gorham, L. M., Polsky, S. L., Prueksaritanont, T., Ramjit, H. G., Slaughter, D. E., y Vyas, K. P. (1999), In vitro and in vivo studies on the metabolism of tirofiban, Drug Metab. Dispos., 27, 1360-1366; McClellan, K. J., y Goa, K. L. (1998), Tirofiban. A review of its use in acute coronary syndromes, Drugs, 56, 1067-1080).

15 La trombocitopenia aguda es una complicación reconocida del tratamiento con inhibidores de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. La trombocitopenia, que a menudo es grave (número de plaquetas menor que $50 \times 10^9/l$), aparece en 0,5% al 1% de los pacientes que reciben abciximab por primera vez (Berkowitz, S. D., Sane, D. C., Sigmon, K. N., Shavender, J. H., Harrington, R. A., Tcheng, J. E., Topol, E. J., y Califf, R. M. (1998), Occurrence and clinical significance of thrombocytopenia in a population undergoing high-risk percutaneous coronary revascularization, Evaluation of c7E3 for the Prevention of Ischemic Complications (EPIC) Study Group, J. Am. Coll. Cardiol., 32, 311-319; Jubelirer, S. J., Koenig, B. A., y Bates, M. C. (1999), Acute profound thrombocytopenia following C7E3 Fab (Abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy, Am. J. Hematol., 61, 205-208; Kereiakes, D. J., Berkowitz, S. D., Lincoff, A. M., Tcheng, J. E., Wolski, K., Achenbach, R., Melsheimer, R., Anderson, K., Califf, R. M., y Topol, E. J. (2000), Clinical correlates and course of thrombocytopenia during percutaneous coronary intervention in the era of abciximab platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade, Am. Heart J., 140, 74-80) y en 4% de los pacientes después de una segunda administración (Madan, M., Kereiakes, D. J., Hermiller, J. B., Rund, M. M., Tudor, G., Anderson, L., McDonald, M. B., Berkowitz, S. D., Sketch, M. H., Jr., Phillips, H. R., 3º, y Tcheng, J. E. (2000), Efficacy of abciximab readministration in coronary intervention, Am. J. Cardiol., 85, 435-440; Tcheng, J. E., Kereiakes, D. J., Braden, G. A., Jordan, R. E., Mascelli, M. A., Langrall, M. A., y Efron, M. B. (1999), Readministration of abciximab: interim report of the ReoPro readministration registry, Am. Heart J., 138, S33-38). En ensayos clínicos del tirofiban, la incidencia varía del 0,1% al 0,5%, que es solo el doble de la incidencia observada en pacientes que no reciben el fármaco (The RESTORE Investigators. Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and Restenosis (1997), Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty, Circulation, 96, 1445-1453; Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators (1998), A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina, N. Engl. J. Med., 338, 1498-

1505; Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators (1998), Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.*, 338, 1488-1497). En el ensayo PURSUIT de eptifibatida, la incidencia fue aproximadamente la misma en pacientes a los que se le administró el fármaco de estudio que en pacientes que recibieron un placebo (McClure, M. W., Berkowitz, S. D., Sparapani, R., Tuttle, R., Kleiman, N. S., Berdan, L. G., Lincoff, A. M., Deckers, J., Diaz, R., Karsch, K. R., Gretler, D., Kitt, M., Simoons, M., Topol, E. J., Califf, R. M., y Harrington, R. A. (1999), Clinical significance of thrombocytopenia during a non-ST-elevation acute coronary syndrome. The platelet glycoprotein IIb/ IIIa in unstable angina: receptor suppression using integrilin therapy (PURSUIT) trial experience, *Circulation*, 99, 2892-2900). Solo un pequeño subconjunto de pacientes que recibieron eptifibatida presentan una inexplicable trombocitopenia profunda (McClure, M. W., Berkowitz, S. D., Sparapani, R., Tuttle, R., Kleiman, N. S., Berdan, L. G., Lincoff, A. M., Deckers, J., Díaz, R., Karsch, K. R., Gretler, D., Kitt, M., Simoons, M., Topol, E. J., Califf, R. M., y Harrington, R. A. (1999), Clinical significance of thrombocytopenia during a non-ST-elevation acute coronary syndrome. The platelet glycoprotein IIb/IIIa in unstable angina: receptor suppression using integrilin therapy (PURSUIT) trial experience, *Circulation*, 99, 2892-2900). La causa de la trombocitopenia inducida por la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ es desconocida, aunque se ha divulgado que los anticuerpos humanos contra los dominios variables de ratón del abciximab, inducidos probablemente por la primera exposición al abciximab, son la causa de la destrucción de las plaquetas en los pacientes que han desarrollado trombocitopenia grave después de recibir abciximab por segunda vez (Curtis, B. R., Swyers, J., Divgi, A., McFarland, J. G., y Aster, R. H. (2002), Thrombocytopenia after second exposure to abciximab is caused by antibodies that recognize abciximab-coated platelets, *Blood*, 99, 2054-2059).

Las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ se unen a una diversidad de proteínas adhesivas que contienen el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD). Aprovechando esta característica, se seleccionaron mAb humanos sintéticos que imitan a la proteína adhesiva que contienen un motivo RGD en HCDR3 flanqueado por seis restos aleatorizados, a partir de bancos de anticuerpos mediante presentación de fagos (Barbas, C. F., 3º, Languino, L. R., y Smith, J. W. (1993), High-affinity self-reactive human antibodies by design and selection: targeting the integrin ligand binding site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10003-10007). Fab-9, el más potente de estos anticuerpos, se une a la integrina $\alpha_v\beta_3$ casi 1.000 veces mejor que a las integrinas $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$. Sin embargo, ninguno de los anticuerpos seleccionados, incluyendo Fab-9, distinguen entre las dos integrinas de β_3 , $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$. Por tanto, se generó un banco de optimización de motivos para determinar si más rondas de modificación y selección sobre el motivo RGD dentro de la HCDR3 de Fab-9 podrían producir un anticuerpo con especificidad por cualquiera de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Smith, J. W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz-Sweeney, S., y Barbas, C. F., 3º (1994), Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins, *J. Biol. Chem.*, 269, 32788-32795). Aunque muchos de los anticuerpos seleccionados mostraron algo de preferencia por la integrina $\alpha_v\beta_3$ o por la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, todos los anticuerpos continúan uniéndose a ambas integrinas. La mayoría de los anticuerpos seleccionados poseen la secuencia consenso (K/R)XD. De modo interesante, la posición intermedia en el motivo RGD demostró ser muy permisiva. Se descubrió que la Gly puede ser sustituida por Val, Ala, Asn, Arg, Thr, Gln, Asp, Ser, y Trp (Smith, J. W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz-Sweeney, S., y Barbas, C. F., 3º (1994), Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins, *J. Biol. Chem.*, 269, 32788-32795).

En Puzon-McLaughlin, W., *et al.* (2000), *Journal of Biological Chemistry*, 275, 7795-7802, se divulga la interacción de ligandos con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. También se divulgan tres anticuerpos anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana que contienen la secuencia RYD similar a RGD en su CDR3 en la cadena pesada y que tienen similitudes estructurales y funcionales con ligandos nativos. Estos mAb inhiben la unión del fibrinógeno a las plaquetas y la agregación de plaquetas dependiente de fibrinógeno.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un inhibidor peptídico de la agregación plaquetaria aislado y purificado, comprendiendo dicho péptido de 9 a aproximadamente 50 restos aminoácidos y teniendo una secuencia de restos aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 5, 6 y 7. En una realización preferida, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:5-7. En otra realización preferida, el péptido consiste en cualquiera de SEQ ID NO:5-7. En una realización más preferida, el péptido consiste fundamentalmente en cualquiera de SEQ ID NO: 5-7.

En otra realización, la invención contempla un anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y comprende una secuencia de restos aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31, en el que la secuencia de restos aminoácidos está dentro de la región determinante de la complementariedad (CDR) HCDR3 del anticuerpo.

En otra realización, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos denominados en la presente RAD3, RAD4, RAD9, RAD11, RAD12, RAD32, RAD34, RAD87, o RAD88, y presenta inmunoreactividad con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

En otra realización, la invención contempla un anticuerpo que tiene inmunoreactividad con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

La invención también contempla procedimientos para utilizar los anticuerpos, las inmunoglobulinas y los péptidos de la invención. En una realización, se selecciona un péptido que tiene una secuencia de restos aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 5, 6 y 7 para su uso para inhibir la agregación plaquetaria.

5 En otra realización, un anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y comprende una secuencia de restos aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31, en el que la secuencia de restos aminoácidos está dentro de una región determinante de la complementariedad HCDR3 del anticuerpo, se emplea para su uso para inhibir la agregación plaquetaria.

10 La invención también contempla un péptido que tiene una secuencia de restos aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 5, 6 y 7 para su uso para inhibir la agregación plaquetaria.

La invención contempla también un anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y comprende una secuencia de restos aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31, en el que la secuencia de restos aminoácidos está dentro de la región determinante de la complementariedad HCDR3 del anticuerpo, para su uso para inhibir la agregación plaquetaria.

15 La invención también contempla un anticuerpo que tiene actividad de unión a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, en el que la unión compite con la actividad de unión de otro anticuerpo, comprendiendo el otro anticuerpo una secuencia de restos aminoácidos dentro de la región determinante de la complementariedad HCDR3 del otro anticuerpo, en el que la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 25, 26, 27, 29, 29, 30 y 31, y en el que la unión se realiza en un ensayo de competición convencional.

20 Otra realización de la invención contempla una composición farmacéutica que comprende el inhibidor peptídico de la agregación plaquetaria y un vehículo farmacéutico adecuado en una forma adecuada para la administración por vía intravenosa, intraarterial, hacia la circulación linfática, intraperitoneal, transdérmica, subcutánea, intramuscular, hacia el espacio articular, o mediante administración pulmonar. Otra realización contempla una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y un
25 vehículo farmacéutico adecuado.

Otra realización de la invención contempla la utilización del inhibidor peptídico de la agregación plaquetaria como medicamento para el tratamiento para prevenir la trombosis en trastornos seleccionados del grupo que consiste en embolia pulmonar, ataques isquémicos transitorios (TIA), trombosis de venas profundas, cirugía de bypass coronario, y cirugía para insertar una válvula o un vaso prostético en un injerto de vasos autólogo, no autólogo o
30 sintético. Otra realización contempla la utilización del anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ como medicamento para un tratamiento para prevenir la trombosis.

En otra realización, el inhibidor peptídico de la agregación plaquetaria también puede utilizarse como medicamento para un tratamiento para prevenir la trombosis en un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en procedimientos de angioplastia realizados con balón, aterectomía coronaria y angioplastia de láser. En otra
35 realización, el anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se emplea como medicamento para un tratamiento para prevenir la trombosis.

En la presente se describe un procedimiento para tratar un sujeto para tratar o prevenir un trastorno de formación de trombos, seleccionándose el trastorno del grupo que consiste en trombosis en embolia pulmonar, ataques isquémicos transitorios (TIA), trombosis de venas profundas, cirugía de bypass coronario, y cirugía para insertar una válvula o un vaso prostético en un injerto de vasos autólogo, no autólogo o sintético, comprendiendo dicho
40 procedimiento administrar al sujeto una cantidad de un péptido que tiene actividad para inhibir con eficacia la agregación plaquetaria para lograr el tratamiento deseado. También se describe un procedimiento para tratar un sujeto para tratar o prevenir un trastorno de formación de trombos, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que es eficaz para lograr el
45 tratamiento deseado.

En un aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor peptídico de la agregación plaquetaria aislado y purificado. El péptido tiene de 9 a aproximadamente 50 restos aminoácidos y una secuencia de restos aminoácidos que se corresponde von V (V/W) CRAD (K/R) RC (ejemplificada por SEQ ID NO:4, 5, 6, y 7). El péptido incluye preferiblemente la secuencia de restos aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:5-7 y, más preferiblemente, tiene
50 la secuencia de restos aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:5-7.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. El anticuerpo incluye la secuencia de restos aminoácidos V (R/G) V (V/W) CRAD (R/K) RYAMDV (ejemplificada por SEQ ID NO:8, 25, 26, 26, 28, 29, 30, y 31) dentro de la región determinante de la complementariedad HCDR3 del anticuerpo. Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los

ejemplos de los anticuerpos preferidos son cinco denominados en la presente RAD3, RAD4, RAD9, RAD11, RAD12, RAD32, RAD34, RAD87, o RAD88. La invención también contempla un anticuerpo que tiene la inmunorreactividad de cualquiera de RAD3, RAD4, RAD9, RAD11, RAD12, RAD32, RAD34, RAD87, o RAD88.

5 En la presente también se describe un procedimiento para inhibir la agregación plaquetaria que incluye la etapa de poner en contacto las plaquetas con una cantidad inhibidora eficaz de un péptido o un anticuerpo de la invención.

También se describe un procedimiento para inhibir la unión del fibrinógeno a las plaquetas, que incluye la etapa de poner en contacto las plaquetas con una cantidad inhibidora eficaz de un péptido o un anticuerpo de la invención.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos que forman una parte de la memoria descriptiva:

10 La figura 1 demuestra que Fab seleccionados se unen a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana, pero no a otras integrinas humanas que se unen a RGD. Se muestran los resultados de un ELISA basado en las integrinas humanas inmovilizadas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ y el sobrenadante que contiene Fabs solubles expresados por *E. coli* transfectado con pComb3X. Se empleó para la detección un mAAb anti-HA de rata conjugado con HRP.

15 La figura 2 demuestra que el Fab RAD87 se une a plaquetas humanas pero no a células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC). Un análisis mediante citometría de flujo demuestra que el Fab RAD87 se une solo a plaquetas humanas, que expresan las dos integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$, pero no a células HUVEC, que expresan principalmente la integrina $\alpha_v\beta_3$. Por contraste, el Fab abciximab se une a plaquetas y a células HUVEC, lo cual confirma la reactividad cruzada documentada con las dos integrinas β_3 . El eje de abscisas indica el número de acontecimientos en escala lineal, y el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica.

20 La figura 3 demuestra que el Fab RAD87 y péptidos sintéticos derivados de secuencias de HCDR3 seleccionadas inhiben la interacción entre la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y fibrinógeno. Se mezcló fibrinógeno biotinilado con (A) diversas concentraciones de Fab RAD87 y abciximab, así como IgG humana reunida como control negativo, y (B) péptidos sintéticos, y se añadió a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ inmovilizada sobre una placa ELISA. Se empleó estreptavidina-HRP para la detección. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

25 La figura 4 demuestra que el Fab RAD87 inhibe la agregación plaquetaria *ex vivo*. Los ensayos de agregación plaquetaria mostrados se derivaron de un lumi-agregómetro de sangre completa. Para cada ensayo se mezclaron 15 μ l de disolución de Fab RAD87 (A) o de Fab abciximab (B) con 435 μ l de plasma rico en plaquetas para alcanzar una concentración final entre 20 nM y 100 nM. Después se añadió ADP hasta una concentración final de 20 μ M y se controló la agregación durante 10 minutos. En (C) se muestran los valores medios y las desviaciones estándar representadas gráficamente de tres experimentos independientes.

30 La figura 5 demuestra que péptidos sintéticos derivados de las secuencias de HCDR3 seleccionadas inhiben la agregación plaquetaria *ex vivo*. Se realizaron ensayos de agregación plaquetaria como se describe en la figura 4 en presencia de las concentraciones de péptidos indicadas. Nótese que los tres péptidos cíclicos con el motivo RAD inhiben con gran potencia la agregación plaquetaria (A-C), mientras que el péptido lineal con el motivo RAD y dos péptidos control con un motivo RAD invertido no tienen efecto sobre el fondo (D). Se empleó el Fab abciximab como control positivo en todos los ensayos de agregación plaquetaria.

La figura 6 muestra las secuencias de restos aminoácidos de una parte de la cadena pesada de los anticuerpos de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención proporciona anticuerpos que inmunorreaccionan con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. El término anticuerpo, en sus diversas formas gramaticales, se emplea en la presente para indicar moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a anticuerpos o paratopo. Los ejemplos de moléculas de anticuerpos son moléculas de inmunoglobulinas intactas, moléculas de inmunoglobulinas sustancialmente intactas, y porciones de moléculas de inmunoglobulinas, incluyendo las porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), anticuerpos de dominio único (dAb), construcciones de inmunoglobulinas plegadas y sus fragmentos activos.

45 Un anticuerpo de la presente invención se prepara y se identifica utilizando la tecnología de presentación de fagos, tal como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO 94/18221). En los ejemplos que aparecen a continuación se ofrece una descripción detallada de estos procedimientos. Un anticuerpo preferido es un anticuerpo humano. La presente invención describe mAAb humanos específicos de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ a partir de un banco de anticuerpos humanos sintéticos recién diseñado. En primer lugar, los dos restos cisteína presentes en los bancos previos se retiraron de HCDR3. La reducción en la longitud

de HCDR3, junto con la eliminación del puente disulfuro, permite potencialmente una mayor flexibilidad estructural en el bucle de HCDR3. La eliminación del puente disulfuro fue estimulada por la observación de que un péptido derivado del HCDR3 de un anticuerpo previamente seleccionado (CSFGRGDIRNC) (SEQ ID NO:1) y su versión lineal GSFGRGDIRNG (SEQ ID NO:2) tienen una eficacia casi idéntica en ensayos de unión de ligandos (Smith, J. W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz-Sweeney, S., y Barbas, C. F., 3^o (1994), Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins, *J. Biol. Chem.*, 269, 32788-32795). En segundo lugar, los inventores escogieron RAD, en lugar de RGD, como motivo central de unión a integrina y aleatorizaron seis restos en la región flanqueante. Un péptido que contiene RAD, GRADSP, se ha utilizado mucho como péptido control inactivo en experimentos en los que se ensayan péptidos que contienen RGD (Wu, M. H., Ustinova, E., y Granger, H. J. (2001), Integrin binding to fibronectin and vitronectin maintains the barrier function of isolated porcine coronary venules, *J. Physiol.*, 532, 785-791; Slepian, M. J., Massia, S. P., Dehdashti, B., Fritz, A., y Whitesell, L. (1998), Beta3-integrins rather than beta1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration, *Circulation*, 97, 1818-1827; Guilherme, A., Torres, K., y Czech, M. P. (1998), Cross-talk between insulin receptor and integrin alpha5 beta1 signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, 273, 22899-22903; Hautanen, A., Gailit, J., Mann, D. M., y Ruoslahti, E. (1989), Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor, *J. Biol. Chem.*, 264, 1437-1442; Adderley, S. R., y Fitzgerald, D. J. (2000), Glycoprotein IIb/IIIa antagonists induce apoptosis in rat cardiomyocytes by caspase-3 activation, *J. Biol. Chem.*, 275, 5760-5766). Sin embargo, el hecho de que los inventores escogiesen RAD a partir de su banco de optimización de motivos (Smith, J. W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz-Sweeney, S., y Barbas, C. F., 3^o (1994), Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins, *J. Biol. Chem.*, 269, 32788-32795), sugiere que los restos flanqueantes determinan si los motivos RAD pueden o no unirse a integrinas. Los inventores establecen la hipótesis de que el motivo RAD, introducido en una región flanqueante aleatorizada, puede aumentar la probabilidad de seleccionar anticuerpos específicos para la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

En la presente se utilizó la presentación de fagos para seleccionar anticuerpos monoclonales específicos para la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ a partir de un banco de anticuerpos humanos sintéticos basándose en la secuencia de HCDR3 aleatorizada VGXXXRADXXXYAMDV (SEQ ID NO:3). Los anticuerpos seleccionados mostraron una fuerte secuencia de aminoácidos consenso en HCDR3 (V (V/W) CRAD (K/R) RC) (ejemplificada por SEQ ID NO:4, 5, 6, y 7) y una alta especificidad hacia la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, pero no hacia otras integrinas que se unen a RGD, tales como las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, y $\alpha_5\beta_1$. Los anticuerpos seleccionados, así como tres péptidos sintéticos VWCRRDRRC (SEQ ID NO:5), VWCRRDKRC (SEQ ID NO:6), y VWCRRDRRC (SEQ ID NO:7), cuyas secuencias se derivan de las secuencias de HCDR3 de los anticuerpos seleccionados, inhibieron con fuerza la interacción entre la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y el fibrinógeno y la agregación plaquetaria *ex vivo*. Según los conocimientos de los inventores, estos son los primeros anticuerpos monoclonales totalmente humanos que son específicos para la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y que pueden inhibir con gran potencia la agregación plaquetaria.

En un aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor peptídico de la agregación plaquetaria aislado y purificado. El péptido tiene de 9 a aproximadamente 50 restos aminoácidos y una secuencia de restos aminoácidos que se corresponde a V (V/W) CRAD (K/R) RC (ejemplificada por SEQ ID NO:4, 5, 6, y 7). El péptido incluye preferiblemente la secuencia de restos aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:5-7 y, más preferiblemente, tiene la secuencia de restos aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:5-7. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. El anticuerpo incluye la secuencia de restos aminoácidos V (R/G) V (V/W) CRAD (R/K) RYAMDV (ejemplificada por SEQ ID NO:8, 25, 26, 26, 28, 29, 30, y 31) dentro de la región determinante de la complementariedad HCDR3 del anticuerpo. El anticuerpo es, lo más preferiblemente, un anticuerpo humano. Los ejemplos de los anticuerpos preferidos son cinco denominados en la presente RAD3, RAD4, RAD9, RAD11, RAD12, RAD32, RAD34, RAD87, o RAD88. La invención también contempla un anticuerpo que tiene la inmunoreactividad de cualquiera de RAD3, RAD4, RAD9, RAD11, RAD12, RAD32, RAD34, RAD87, o RAD88.

En la presente se describe un procedimiento para inhibir la agregación plaquetaria que incluye la etapa de poner en contacto las plaquetas con una cantidad inhibidora eficaz de un péptido o un anticuerpo de la invención.

También se describe un procedimiento para inhibir la unión del fibrinógeno a las plaquetas, que incluye la etapa de poner en contacto las plaquetas con una cantidad inhibidora eficaz de un péptido o un anticuerpo de la invención.

La presente invención describe, en una realización, anticuerpos monoclonales humanos que contienen un sitio de unión según describe en la presente y que se unen específicamente a una molécula diana preseleccionada. La invención también describe líneas celulares que producen los anticuerpos, procedimientos para producir las líneas celulares, y procedimientos para producir los anticuerpos monoclonales humanos.

En la medida en que una proteína de presentación de esta invención sobre una partícula de fágido es, en realizaciones preferidas, una proteína de fusión entre una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina y un anclaje de la membrana de un fago filamentoso, debe entenderse que la proteína de presentación es, en efecto, una

cadena pesada o ligera de inmunoglobulina modificada en la cual se ha introducido un sitio de unión. Además, en muchas realizaciones, la expresión de la proteína de presentación se prepara sobre la superficie de un fágido como un heterodímero formado entre péptidos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, constituyendo una u otra una proteína de fusión con el anclaje de la membrana. Así, cuando se emplea la cadena pesada como proteína de fusión, una proteína de presentación, en realizaciones preferidas, comprende un fragmento Fab que tiene una cadena pesada anclada asociada con una cadena ligera.

La presente invención también describe, en una realización, polinucleótidos que codifican anticuerpos monoclonales humanos que contienen un sitio de unión, según se describe en la presente, y estos anticuerpos monoclonales humanos se unen específicamente a una molécula diana preseleccionada. Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos monoclonales humanos pueden secuenciarse para identificar la secuencia polinucleotídica. Los procedimientos para la secuenciación del ADN son muy conocidos en la técnica y pueden utilizarse para practicar cualquiera de las realizaciones de la invención. Los procedimientos pueden emplear enzimas, tales como el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I; SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland Ohio), Taq polimerasa (Perkin-Elmer), polimerasa de T7 termoestable (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway N.J.), o combinaciones de polimerasas y exonucleasas de corrección, tales como las que se encuentran en el sistema de amplificación ELONGASE (Life Technologies, Gaithersburg Md.). Preferiblemente, la preparación de la secuencia se automatiza con máquinas, tales como Hamilton MICROLAB 2200 (Hamilton, Reno Nev.), el termociclador 200 de Peltier (PTC200, MJ Research, Watertown Mass.) y ABI CATALYST 800 (Perkin-Elmer). Entonces se realiza la secuenciación utilizando los sistemas de secuenciación de ADN ABI 373 o 377 (Perkin-Elmer), el sistema de secuenciación de ADN MEGABACE 1000 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.), u otros sistemas conocidos en la técnica. Las secuencias resultantes se analizan utilizando una diversidad de algoritmos que son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. (1997), Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York N.Y, unidad 7.7; Meyers, R. A. (1995), Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, Nueva York N.Y, pp. 856-853).

La preparación de líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales de la invención se describe con más detalle en la presente, y puede realizarse utilizando los procedimientos de mutagénesis de vectores fágidos descritos en la presente, y empleando técnicas de selección habituales que permiten la determinación de los patrones de unión elementales del anticuerpo monoclonal de interés, indicativas de que se ha producido un sitio de unión. Así, si el anticuerpo monoclonal humano que se está ensayando se une a la molécula diana preseleccionada, entonces el anticuerpo monoclonal humano que se está ensayando y el anticuerpo monoclonal humano producido por las líneas celulares de la invención se consideran equivalentes.

También es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal humano tiene la misma (es decir, equivalente) especificidad que un anticuerpo monoclonal humano de esta invención, determinando si el primero evita que el segundo se una a una molécula diana preseleccionada. Si el anticuerpo monoclonal humano que se está ensayando compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, tal como se muestra mediante una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal humano de la invención en ensayos de competición convencionales para la unión a moléculas diana cuando están presentes en fase sólida, entonces es probable que los dos anticuerpos monoclonales se unan al mismo epitopo o a un epitopo estrechamente relacionado.

Otra forma de determinar si un anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un péptido o un anticuerpo monoclonal humano de la invención es preincubar el péptido o el anticuerpo monoclonal humano de la invención con la molécula diana con la que normalmente es reactiva, y después añadir el anticuerpo monoclonal humano que se está ensayando para determinar si el anticuerpo monoclonal humano que se está ensayando es inhibido en su capacidad para unirse a la molécula diana. Si el anticuerpo monoclonal humano que se está ensayando es inhibido, entonces con toda probabilidad tiene la misma especificidad de epitopo, o una especificidad de epitopo funcionalmente equivalente, que el péptido o el anticuerpo monoclonal de la invención.

Otra forma para determinar si un anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal humano de la invención es determinar la secuencia de restos aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos en cuestión. Las moléculas de anticuerpos que tienen secuencias de restos aminoácidos idénticas, o funcionalmente equivalentes, en sus regiones CDR tienen la misma especificidad de unión. Los procedimientos para secuenciar péptidos son muy conocidos en la técnica.

La inmunoespecificidad de un anticuerpo, su capacidad de unión a la molécula diana y la afinidad relacionada que muestra el anticuerpo por el epitopo son definidas por el epitopo con el que inmunorreacciona el anticuerpo. La especificidad del epitopo viene definida, al menos en parte, por la secuencia de restos aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina del anticuerpo y, en parte, por la secuencia de restos aminoácidos de la región variable de cadena ligera.

Se prefiere en particular un anticuerpo monoclonal humano que tenga la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal producido por un microorganismo *E. coli* o un microorganismo fúngico o una célula de hibridoma o

producido por un vector plasmídico, tal como se describe a continuación en la presente. Estos procedimientos para producir péptidos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos son muy conocidos en la técnica. El uso de la expresión "tiene la especificidad de unión de" indica que anticuerpos monoclonales equivalentes muestran las mismas o similares propiedades de inmunorreacción (unión) y compiten por la unión a una molécula diana preseleccionada.

5 La expresión "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido de origen no sustituido, con la condición de que los anticuerpos que portan el péptido sustituido también se unan a la molécula diana preseleccionada. De modo análogo, otra realización preferida de la invención se refiere a polinucleótidos que codifican los péptidos de cadena pesada y/o ligera indicados anteriormente, y a secuencias polinucleotídicas que son complementarias con estas secuencias polinucleotídicas. Las secuencias polinucleotídicas complementarias incluyen las secuencias que se hibridan con las secuencias polinucleotídicas de la invención bajo condiciones de hibridación rigurosas.

10 Los anticuerpos monoclonales humanos ofrecen ventajas concretas frente a los anticuerpos monoclonales murinos, en particular en la medida en que pueden utilizarse de modo terapéutico en seres humanos. De modo específico, los anticuerpos humanos no se eliminan de la circulación con tanta rapidez como los antígenos "extraños", y no activan al sistema inmunológico de la misma manera que los antígenos extraños y los anticuerpos extraños.

15 La invención contempla, en una realización, un anticuerpo monoclonal de esta invención, producido mediante los presentes procedimientos.

20 En otra realización preferida, la invención contempla una molécula de inmunoglobulina truncada que comprende un fragmento Fab derivado de un anticuerpo monoclonal humano de esta invención. El fragmento Fab, sin el receptor Fc, es soluble y proporciona ventajas terapéuticas respecto a la semivida sérica, y ventajas de diagnóstico respecto a los modos de utilizar el fragmento Fab soluble. La preparación de un fragmento Fab soluble en general es conocida en las técnicas inmunológicas y puede realizarse mediante una diversidad de procedimientos. En la presente se describe un procedimiento preferido para producir un fragmento Fab soluble.

25 Preferiblemente, un anticuerpo de esta invención inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$. Es decir, un anticuerpo muestra una unión preferente a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$, comparado con otras integrinas. En la presente se describen ejemplos de anticuerpos preferidos y se denominan RAD3, RAD4, RAD9, RAD11, RAD12, RAD32, RAD34, RAD87, o RAD88. Las secuencias de restos aminoácidos de la región VH de estos anticuerpos se indican en la figura 6.

30 Los anticuerpos monoclonales humanos particularmente preferidos son los que presentan la especificidad de inmunorreacción (unión) de un anticuerpo monoclonal que tiene secuencias de restos aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (H) y ligera (L) de una inmunoglobulina en parejas (H:L), en los que la cadena ligera es la cadena ligera descrita en la presente, y la cadena pesada tiene una de las secuencias mostradas en la figura 6 y sus sustituciones conservativas.

35 Las sustituciones conservativas son las sustituciones en las que al menos un resto en la secuencia de aminoácidos se ha eliminado y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Estas sustituciones en general se realizan según la tabla 2 cuando se desea mantener la actividad de la proteína. La tabla 2 muestra aminoácidos que pueden ser sustituidos por un aminoácido en una proteína y que generalmente se consideran sustituciones conservativas.

Tabla 2

Resto	Sustituciones conservativas
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Gln	Asn
Cys	Ser
Glu	Asp
Gly	Pro

His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr; Gly
Thr	Ser; Val
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Las sustituciones que son menos conservativas que las que aparecen en la tabla 2 pueden seleccionarse eligiendo restos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Las sustituciones de las cuales se espera, en general, que produzcan los mayores cambios en las propiedades de las proteínas serán aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o una prolina se sustituye por cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por otro que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Pueden utilizarse diversos procedimientos, tales como un análisis de Scatchard junto con técnicas de radioinmunoensayo, para evaluar la afinidad de los anticuerpos por la integrina. La afinidad se expresa como una constante de asociación, K_a , que se define como la concentración molar del complejo de integrina-anticuerpo dividida entre las concentraciones molares del antígeno libre y el anticuerpo libre bajo condiciones de equilibrio. La K_a determinada para una preparación de anticuerpos policlonales, que son heterogéneos en sus afinidades por múltiples epitopos de integrinas, representa la afinidad media, o aivez, de los anticuerpos por la integrina. La K_a determinada para una preparación de anticuerpos monoclonales, que son monoespecíficos por un epitopo de integrina concreto, representan una verdadera medición de la afinidad. Se prefieren preparaciones de anticuerpos de alta afinidad con una K_a que varía de aproximadamente 10^9 a 10^{12} l/mol, para su uso en inmunoensayos en los que el complejo de integrina-anticuerpo debe someterse a manipulaciones rigurosas. Se prefieren preparaciones de anticuerpos de baja afinidad con una K_a que varía de aproximadamente 10^6 a 10^7 l/mol, para su uso en la inmunopurificación y procedimientos similares que, en último término, requieren la disociación de la integrina, preferiblemente en forma activa, del anticuerpo (Catty, D. (1988), *Antibodies, Volume I: A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D. C.; y Liddell, J. E. y Cryer, A. (1991), *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y)

La afinidad también puede expresarse como la constante de disociación o K_d . Las afinidades de unión preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación K_d menor que 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, o 10^{-13} M.

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido que inhibe la agregación plaquetaria. El péptido tiene de 9 a aproximadamente 50 restos aminoácidos y se deriva de un anticuerpo de esta invención. Preferiblemente, el péptido incluye una secuencia de restos aminoácidos que se corresponde con la fórmula V (V/W) CRAD (K/R) RC (ejemplificada por SEQ ID NO:4, 5, 6, y 7). En los ejemplos que aparecen a continuación se presentan ejemplos de péptidos preferidos.

La presente invención contempla composiciones terapéuticas útiles para practicar los procedimientos terapéuticos descritos en la presente. Las composiciones terapéuticas de la presente invención contienen un vehículo fisiológicamente tolerable junto con al menos una especie de un anticuerpo monoclonal humano o un péptido derivado de este según se describe en la presente, disuelto o dispersado en él como principio activo. En una

realización preferida, la composición terapéutica no es inmunogénica cuando se administra a un paciente humano para objetivos terapéuticos.

5 Tal como se emplean en la presente, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y sus variaciones gramaticas, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se utilizan de modo intercambiable e indican que los materiales son capaces de ser administrados a un ser humano, o sobre un ser humano, sin la producción de efectos fisiológicos no deseable, tales como náuseas, mareos, malestar gástrico y similares.

10 La preparación de una composición farmacológica que contenga principios activos disueltos o dispersados en ella es bien conocida en la técnica. Generalmente, estas composiciones se preparan como inyectables estériles, en disoluciones o suspensiones líquidas, acuosas o no acuosas; sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquidos antes del uso. La preparación también puede emulsionarse. Así, una composición que contiene moléculas de anticuerpos puede tomar la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvo, u otras formas de composiciones.

15 El principio activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y sus combinaciones. Además, si se desea, la composición puede contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares, tales como agente humectantes o emulgentes, agentes tamponantes del pH y similares, que potencian la
20 eficacia del principio activo.

La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de sus componentes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres del péptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los
25 grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y de bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

Los vehículos fisiológicamente tolerables son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos de vehículos líquidos son disoluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y el agua, o contienen un tampón, tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, disolución salina fisiológica o ambos, tal como
30 disolución salina tamponada con fosfato. Además, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tamponante, así como sales, tales como cloruro de sodio y potasio, dextrosa, propilenglicol, polietilenglicol y otros solutos.

Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además del agua o con la exclusión del agua. Los ejemplos de estas otras fases líquidas son la glicerina, aceites vegetales, tales como aceite de algonodero, ésteres orgánicos, tales como oleato de etilo, y emulsiones de agua en aceite.

Una composición terapéutica contiene un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención, generalmente en una cantidad de al menos 0,1% en peso del anticuerpo por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una proporción en peso del anticuerpo a la composición total. Así, por ejemplo, 0,1% en peso es 0,1 gramos de anticuerpo por 100 gramos de composición total.

Preferiblemente, una composición terapéutica que contiene anticuerpos generalmente contiene de aproximadamente 10 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por ml de anticuerpo como principio activo por volumen de la composición, y más preferiblemente contiene de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (es decir, de aproximadamente 0,1% a 1% en peso).

45 Una composición terapéutica en otra realización contiene un péptido de la presente invención, generalmente en una cantidad de al menos 0,1% en peso del péptido por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una proporción en peso del péptido a la composición total. Así, por ejemplo, 0,1% en peso es 0,1 gramos de péptido por 100 gramos de composición total.

50 Preferiblemente, una composición terapéutica que contiene péptidos generalmente contiene de aproximadamente 10 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por ml de péptido como principio activo por volumen de la composición, y más preferiblemente contiene de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (es decir, de aproximadamente 0,1% a 1% en peso).

En otro aspecto, la presente invención contempla las composiciones y los compuestos de la invención para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente. A la vista del beneficio de la utilización de anticuerpos

monoclonales humanos *in vivo* en pacientes humanos, los anticuerpos descritos en la presente están particularmente bien adaptados para un uso *in vivo* como reactivo terapéutico para bloquear o inhibir la función de la molécula diana a la cual se une el anticuerpo. Los péptidos derivados de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente también se contemplan para su uso en los procedimientos terapéuticos. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra, de la cual se cree que contiene la molécula diana, con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humano o un péptido de esta invención que se une a la molécula diana.

Para las modalidades *in vivo*, el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que contiene un anticuerpo monoclonal humano o un péptido de la invención.

Los intervalos de dosificación para la administración de los anticuerpos monoclonales y los péptidos de la invención son los intervalos que sean lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado, en el que los síntomas de la enfermedad mediados por la molécula diana se mejoran. La dosificación no debe ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. En general, la dosificación variará según la edad, el trastorno, el sexo y el alcance de la enfermedad en el paciente, y puede ser determinada por los expertos en la técnica. La dosificación puede ser ajustada por el médico encargado si se produce cualquier complicación.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de esta invención generalmente es una cantidad del anticuerpo que, cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable, es suficiente para lograr una concentración plasmática de aproximadamente 0,1 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y normalmente de aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dicho de otro modo, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, de uno o varios días.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de esta invención es generalmente una cantidad del péptido que, cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable, es suficiente para lograr una concentración plasmática de aproximadamente 0,1 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y preferiblemente de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dicho de otro modo, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, y preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, de uno o varios días.

Los anticuerpos monoclonales humanos o los péptidos de la invención pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual a lo largo de un periodo de tiempo. Aunque, en el cuerpo, la molécula diana generalmente es accesible mediante administración sistémica y, por tanto, se trata con mayor frecuencia mediante una administración intravenosa de las composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de administración cuando exista la probabilidad de que el tejido diana contenga la molécula diana. Así, los anticuerpos monoclonales humanos o los péptidos de la invención pueden administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, transdérmica, y pueden administrarse por medios peristálticos.

Las composiciones terapéuticas que contienen un anticuerpo monoclonal humano o un péptido de la invención se administran de modo convencional por vía intravenosa, tal como mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria", cuando se emplea haciendo referencia a una composición terapéutica de la presente invención, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido, es decir, vehículo o portador.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar, de la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el principio activo, y del grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas del ingrediente activo que se van a administrar dependen del criterio del médico y son particulares de cada individuo. Sin embargo, en la presente se describen intervalos de dosificación adecuados para la aplicación sistémica y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración también son variables, pero son tipificados por una administración inicial, seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas con la posterior inyección u otra administración. Como alternativa, se contempla una infusión intravenosa continua suficiente para mantener las concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para las terapias *in vivo*.

Puede utilizarse un anticuerpo monoclonal humano anti-integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ o un péptido derivado de este que contiene un sitio de unión a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ para modular *in vivo* o *in vitro* la función de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ sobre las plaquetas. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humano o el péptido puede utilizarse en una composición farmacéuticamente aceptable que, cuando se administra a un sujeto humano en una cantidad eficaz, es capaz de inhibir la agregación de las plaquetas y, con ello, disminuir la tasa de formación de trombos. Así, la administración *in vivo* de un anticuerpo monoclonal humano anti-integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que inhibe la agregación plaquetaria puede utilizarse *in vivo* para modular cualquier respuesta fisiológica iniciada por la adhesión plaquetaria, tal como la coagulación y algunas respuestas inflamatorias.

Cuando este procedimiento se realiza *in vivo*, una cantidad eficaz de una composición de anticuerpos o péptidos que contiene un diluyente fisiológicamente tolerable y moléculas de anticuerpos que inmunorreaccionan con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y que inhiben la agregación plaquetaria se administra por vía intravenosa a un mamífero, y el mamífero se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que las moléculas de los anticuerpos inmunorreaccionen con cualquier integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ presente y formen un producto de inmunorreacción, y para permitir que el sitio de unión que contiene el péptido se una a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y forme un complejo de péptido-receptor, de modo que el ligando normal ya no pueda unirse al receptor.

Los anticuerpos específicos de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de esta invención son útiles como agentes terapéuticos antitrombóticos. Los anticuerpos (o sus fragmentos) pueden utilizarse para inhibir la agregación plaquetaria y la formación de trombos. Los anticuerpos también pueden utilizarse para inhibir las variaciones de flujo cíclicas que son provocadas por la agregación plaquetaria y que puede preceder a la formación o la reformación de trombos. Los anticuerpos pueden utilizarse en una diversidad de situaciones en las que debe evitarse la formación o la reformación (reoclusión) de trombos. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse a un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) para prevenir la trombosis en la embolia pulmonar, ataques isquémicos transitorios (TIA), trombosis de venas profundas, cirugía de bypass coronario, y cirugía para insertar una válvula o un vaso prostético (por ejemplo, en un injerto de vasos autólogo, no autólogo o sintético). Los anticuerpos de la presente invención también pueden administrarse a un individuo para prevenir la agregación plaquetaria y la trombosis en procedimientos de angioplastia realizados con balón, aterectomía coronaria, angioplastia de láser u otros procedimientos adecuados. Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse antes de un procedimiento de angioplastia (preangioplastia), durante la angioplastia o después de la angioplastia (posangioplastia). Este tratamiento puede prevenir la trombosis y, con ello, reducir la tasa de complicaciones trombóticas después de una angioplastia, tal como la muerte, infarto de miocardio o acontecimientos isquémicos recurrentes que necesiten PTCA o cirugía de bypass coronario.

La agregación de las plaquetas activa la cascada de la coagulación y produce una red de fibrina más estable y un coágulo oclisor, que puede ser lisado por agentes trombolíticos. El anticuerpo puede administrarse a un individuo (por ejemplo, un ser humano) solo o junto con un agente trombolítico, tal como un activador del plasminógeno (por ejemplo, un activador del plasminógeno tisular, uroquinasa o estreptoquinasa, un activador del plasminógeno tisular recombinante) o un anticoagulante o un agente antiplaquetas, tal como aspirina, heparina o un anticoagulante de cumarina (por ejemplo, warfarina), para prevenir o reducir la reoclusión que puede producirse después de una trombosis y para acelerar la lisis de los coágulos. El anticuerpo o el fragmento puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración del agente trombolítico o anticoagulante, en cantidades suficientes para prevenir la agregación plaquetaria que puede producir una reoclusión.

Una cantidad eficaz (por ejemplo, una cantidad suficiente para la inhibición de la agregación plaquetaria y, con ello, la inhibición de la formación de trombos) del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo puede administrarse por vía parenteral, preferiblemente por vía intravenosa, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina estéril. Puede incluirse un medio tamponado. La formulación de anticuerpos puede contener suficientes aditivos adicionales, tales como un estabilizante (por ejemplo, Polysorbate 80, USP/NF). El anticuerpo puede administrarse en una única dosis, de modo continuo o en múltiples infusiones (por ejemplo, una inyección en embolada, seguida de una infusión continua). Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse mediante un mecanismo de liberación controlada (por ejemplo, mediante un polímero o un sistema de administración en parches) o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. La cantidad que se va a administrar dependerá de una diversidad de factores, tales como los síntomas clínicos, el peso del individuo, y si se están administrando otros fármacos (por ejemplo, agentes trombolíticos).

Las inmunoglobulinas específicas de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, de esta invención también son útiles para la formación de imágenes de trombos. Para este objetivo, en general se prefieren fragmentos de anticuerpos. Tal como se describió anteriormente, puede diseñarse un gen de cadena pesada quimérico en forma truncada para producir un fragmento de inmunoglobulina quimérica (por ejemplo, Fab, Fab', o F(ab')₂) para la formación de imágenes de inmunocentelleo. Estas moléculas pueden marcarse de modo directo o a través de un agente quelante acoplado, tal como DTPA, con radioisótopos tales como ¹³¹Yodo, ¹²⁵Yodo, ^{99m}Tecnecio o ¹¹¹Indio, para producir agentes de radioinmunocentelleo. Como alternativa, puede introducirse un dominio de unión a un radiometal (quelante) en el

sitio del anticuerpo quimérico para proporcionar un sitio para el marcaje. Así, puede diseñarse una inmunoglobulina como una proteína que tiene una región variable específica de plaquetas no humana, una región constante humana (preferiblemente truncada), y un dominio de unión a metales derivado de una proteína de unión a metales, tal como metalotioneína.

- 5 La inmunoglobulina específica de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se administra a un paciente sospechoso de tener un trombo. Después de un tiempo suficiente para permitir que la inmunoglobulina marcada se localice en el sitio del trombo, la señal generada por el marcador se detecta mediante un dispositivo de fotobarrido, tal como una cámara gamma. La señal detectada después se convierte en una imagen del trombo. La imagen hace posible localizar el trombo *in vivo* y diseñar una estrategia terapéutica apropiada.
- 10 Los siguientes ejemplos ilustran ejemplos de realizaciones de la presente invención y no limitan la memoria descriptiva ni las reivindicaciones de ningún modo.

Ejemplos

Línea celular, proteínas y péptidos

- 15 Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron en Biowhittaker (Walkersville, MA) y se cultivaron en medio EGM-2 (Biowhittaker) suministrado con las células. La integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se obtuvo en Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN). Las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ se obtuvieron en Chemicon (Temecula, CA). El fibrinógeno humano se obtuvo en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los péptidos utilizados en este estudio fueron sintetizados por Peptron (Taejon, Corea). El fibrinógeno humano y los péptidos se biotinilaron utilizando EZ-Link-PFP-biotina (Pierce, Rockford, IL) siguiendo las instrucciones del fabricante. El abciximab (ReoPro) fue obtenido en Eli Lilly (Indianápolis, IN).
- 20

Generación de bancos

- 25 Se preparó el ARN total de la médula ósea de seis donantes sanos utilizando TRI REAGENT (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). La primera hebra de ADNc se sintetizó utilizando el sistema de preamplificación SUPERScript con cebado de oligo(dT) (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Un fragmento de ADNc que codifica parte de FR3, HCDR3 aleatorizado, y FR4 de V_H unido a C_H1 se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores neo-rad-f (GTG TAT TAC TGT GCG AGA GTG GGG NNK NNK NNK CGT GCC GAC NNK NNK NNK TAC GCT ATG GAC GTC TGG GGC) (SEQ ID NO:9) y dpseq (AGAAGC GTA GTC CGG AAC GTC) (SEQ ID NO:10) y el vector de fágido pComb3X-TT (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) como molde. Para la amplificación del fragmento de ADNc que codifica FR1 a FR3 de V_H , el ADNc de médula ósea humana preparado se sometió a una PCR utilizando los cebadores DP-47N-term (GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA) (SEQ ID NO:11) y DP-47FR3 (CAC TCT CGC ACA GTAATA CAC GGC CGT GTC CTC GGC TCT) (SEQ ID NO:12). Todas las amplificaciones se realizaron bajo condiciones de PCR convencionales utilizando *Taq* polimerasa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Los dos fragmentos de ADNc se ensamblaron mediante PCR de extensión de solapamiento utilizando los cebadores lead-VH (GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC) (SEQ ID NO:13) y dp-Ex (GAG GAG GAG GAG GAG GAG AGAAGC GTA GTC CGG AAC GTC) (SEQ ID NO:14). Un ADNc de cadena ligera kappa human DPK-26 previamente seleccionado en el vector de fágido pComb3X se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores ompseq (AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG) (SEQ ID NO:15) y leadB (GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC) (SEQ ID NO:16). Los ADNc que codifican el banco de fragmentos de cadena pesada y la cadena ligera se condensaron mediante PCR de extensión de solapamiento utilizando los cebadores ompseq y dp-Ex. El banco que codifica Fab resultante se digirió con *Sfi* I (Roche, Indianápolis, IN), se acopló en el vector de fágido pComb3X, y se transformó en la cepa ER2537 de *E. coli* (New England Biolabs, Beverly, MA) según se ha descrito (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).
- 30
- 35
- 40
- 45

Selección del banco

- 50 Se realizó un total de siete rondas de inmunoadsorción (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Primero se realizaron cinco rondas de inmunoadsorción contra la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana inmovilizada utilizando 100 ng de proteína en 50 μ l de tampón de metal (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 137 mM, KCl 1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM y MnCl₂ 1 mM) para el revestimiento, Tween 20 al 0,05% en TBS (disolución salina tamponada con Tris) para el lavado, y tripsina 10 mg/ml (Becton-Dickson, Franklin Lakes, NJ) en TBS para la elución. Se emplearon placas de 96 pocillos Costar 3690 (Corning, NY) para la inmunoadsorción. La tripsinización se realizó durante 30 min a 37 °C. Para la sexta ronda de inmunoadsorción, se emplearon 25 ng de proteína en tampón de metal para el revestimiento, y Tween 20 al 0,5% en PBS para el lavado. Para la séptima ronda de
- 55

inmunoadsorción, se emplearon 12,5 ng de proteína para el revestimiento. La placa se lavó cinco veces en la primera ronda, diez veces en la segunda y tercera ronda, y 15 veces en las cuatro rondas restantes. Se controló el agrupamiento de fagos de salida de cada ronda mediante ELISA de fagos empleando anti-M13 de oveja conjugado con peroxidasa de rábano (Pharmacia) como anticuerpo secundario. Después de la última ronda de inmunoadsorción, los fagos se produjeron a partir de clones individuales cultivados en placas de salida y se ensayó la unión a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediante ELISA de fagos según se ha descrito (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Reorganización de la cadena ligera y selección

Se amplificaron ADNc que codifican V_{κ} y V_{λ} a partir del ADNc de médula ósea humana preparado utilizando un panel de cebadores previamente publicado (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York), que comprende cebadores sentido que se hibridan con secuencias que codifican los aminoácidos N-terminales de las diversas familias de V_{κ} y V_{λ} , y cebadores inversos que se hibridan con secuencias que codifican los aminoácidos C-terminales de FR4 de V_{κ} y V_{λ} , respectivamente, que están muy conservados (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., y Foeller, C. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Natl. Inst. Health, Bethesda). Las secuencias codificadoras de C_{κ} y C_{λ} se prepararon como se ha descrito previamente (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) y se condensaron con las secuencias codificadoras de V_{κ} y V_{λ} , respectivamente, mediante una PCR de extensión de solapamiento utilizando los cebadores RSC-F (GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC) (SEQ ID NO: 17) y lead-B (GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC) (SEQ ID NO: 18). Se emplearon dos estrategias de clonación para reemplazar la cadena ligera kappa humana DP-26 en el Fab seleccionado. En una estrategia, el ADNc de la cadena ligera kappa humana DPK-26 se retiró del agrupamiento de vectores de fágmidos obtenido después de la última ronda de inmunoadsorción mediante una digestión de restricción con *SacI* y *XbaI* (New England Biolabs). Después, el banco que codifica las cadenas ligeras humanas se digirió con las mismas enzimas de restricción, se acopló en el vector de fágmido preparado, y se transformó en la cepa ER2537 de *E. coli*. En la segunda estrategia, el ADNc que codifica el fragmento de cadena pesada se amplificó a partir del agrupamiento de vectores de fágmidos obtenido después de la última ronda de inmunoadsorción utilizando los cebadores lead-HV y dpseq, y se condensó con el banco que codifica las cadenas ligeras humanas mediante una PCR de extensión de solapamiento utilizando los cebadores ompseq y dp-EX. El banco que codifica Fab resultante se digirió con *SfiI*, se acopló en el vector de fágmido pComb3X, y se transformó en la cepa ER2537 de *E. coli* según se ha descrito previamente (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Después de mezclar los dos bancos de cadenas ligeras, se realizaron tres rondas de inmunoadsorción, cada una con 12,5 ng de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana revestida. La placa se lavó 15 veces en cada ronda. Después de la última ronda de inmunoadsorción, se produjeron fagos a partir de clones individuales cultivados sobre placas de salida y se ensayaron para la unión a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediante ELISA de fagos, según se ha descrito previamente (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Elisa

Para la producción de Fab soluble se siguieron procedimientos publicados (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Brevemente, se dejó que colonias seleccionadas crecieran en 5 ml de supercaldo durante 6 h a 37 °C. El crecimiento continuó durante la noche después de añadir IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido, Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de 1 mM. Para cada pocillo de una placa de 96 pocillos Costar 3690, 100 ng de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en 50 μ l de tampón de metal se revistieron a 4 °C durante la noche. La placa se bloqueó mediante la adición de leche desnatada al 3% (en p/v) en TBS, seguido de una incubación durante 1 h a 37 °C. Después se añadieron secuencialmente 50 μ l del sobrenadante del cultivo diluido con el mismo volumen de leche desnatada al 3% (en p/v) en TBS, 50 μ l de mAb ant-HA de rata conjugado con peroxidasa de rábano 3F10 (Roche) diluido hasta 1 μ g/ml en leche desnatada al 3% en TBS, y 50 μ l de disolución de sustrato ABTS (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Antes de añadir los reactivos, la placa se lavó cinco veces con Tween 20 al 0,05% en TBS. La placa se incubó durante 1 h a 37 °C en cada etapa. Para comprobar la reactividad cruzada del Fab seleccionado, se realizaron ensayos en paralelo con las integrinas revestidas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, y $\alpha_5\beta_1$ utilizando las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

Ensayo de inhibición de la unión de fibrinógeno

Se revistieron los pocillos de una placa de 96 pocillos Costar 3690 con 100 ng de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en 50 μ l de tampón de metal a 4 °C durante la noche. La placa se lavó dos veces con agua y se bloqueó con 160 μ l de leche desnatada al 3% (en p/v) en TBS durante 1 hora a 37 °C. Después de haber lavado brevemente la placa con agua, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de sobrenadante del cultivo que contiene Fab, Fab RAD87 purificado y abciximab, o péptidos sintéticos mezclados con 50 μ l de fibrinógeno biotinilado 1,2 μ M en leche desnatada al 3% (en p/v) en TBS. Las concentraciones finales se ajustaron entre $1,3 \times 10^{-8}$ M y $8,0 \times 10^{-7}$ M de Fab, y entre $8,9 \times 10^{-8}$ M y $9,1 \times 10^{-5}$ M de péptidos sintéticos. Después de una incubación durante 2 h a 37 °C, seguido de diez lavados con agua y cinco lavados con Tween 20 al 0,05% en TBS, se añadieron 50 μ l de estreptavidina-HRP 0,5 μ g/ml (Pierce) diluido en leche desnatada al 3% (en p/v) en TBS, y se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de lavar como se indicó anteriormente, se añadieron 50 μ l de disolución de sustrato ABTS (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). El experimento se repitió tres veces en cada concentración para obtener el valor medio y la desviación estándar.

Citometría de flujo

Se extrajo sangre periférica de un voluntario sano y se recogió en un tubo ACD (Becton Dickinson, San José, CA). Las HUVEC se trataron durante 5 min con tripsina al 0,05% (en p/v), EDTA 0,53 mM (Life Technologies), se recogieron mediante centrifugación a 500 g durante 2 min, y se resuspendieron en BSA al 1% (en p/v) en PBS (disolución salina tamponada con fosfato). Después, se añadió el Fab RAD87 o Fab abciximab a las células resuspendidas en 40 μ l de BSA al 1% (en p/v) en PBS o 40 μ l de sangre periférica para alcanzar una concentración final de 0,2 μ M. Después de una incubación durante 40 min a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con BSA al 1% (en p/v) en PBS, se añadieron 10 μ l de anticuerpos policlonales anti-IgG humana conjugados con FITC (Sigma-Aldrich) diluidos en 750 μ l de BSA al 1% (en p/v) en PBS y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces con BSA al 1% (en p/v) en PBS se realizó una citometría de flujo utilizando un instrumento FACstar de Becton Dickinson (San José, CA).

Ensayo de agregación plaquetaria

Se recogió sangre humana periférica como se describió anteriormente. Se obtuvo un plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de la sangre periférica recogida mediante centrifugación a 135 g durante 15 min. Una posterior centrifugación a 1.500 g durante 15 m produjo un plasma pobre en plaquetas (PPP). Mezclando el PRP y el PPP, se preparó un plasma acondicionado de 300.000-350.000 plaquetas por 1 μ l de plasma. A 435 μ l del plasma acondicionado se le añadieron los mAb RAD87, abciximab y péptidos disueltos en 15 μ l de PBS hasta una concentración final de entre 20 nM y 100 nM de mAb y de entre 0,4 μ M y 90 μ M de péptidos. El ensayo de agregación plaquetaria se realizó como se ha descrito previamente (Klinkhardt, U., Kirchmaier, C. M., Westrup, D., Breddin, H. K., Mahnel, R., Graff, J., Hild, M., y Harder, S. (2000), Differential in vitro effects of the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors abciximab or SR121566A on platelet aggregation, fibrinogen binding and platelet secretory parameters, Thromb. Res., 97, 201-207) utilizando un lumiagregómetro de sangre completa (Chrono-log, Havertown, PA). Se controló la impedancia de cada muestra hasta que se estableció una línea de base estable (<5 mV de deriva por minuto). Para inducir la agregación plaquetaria se añadieron 9 μ l de una disolución de ADP hasta alcanzar una concentración final de 20 μ M. El aumento en la impedancia a través de un par de electrodos a lo largo del tiempo se transmitió a través de una interfase hasta un ordenador personal para el análisis (AGGRO/LINK, Chrono-log).

Medición de la afinidad

La constante de disociación de los Fab RAD87 y abciximab hacia la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se determinó con un ELISA competitivo, según se ha descrito previamente (Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M. E., y Figue, B. (1996), Measuring antibody affinity in solution, en Antibody Engineering (McCafferty, J., Hoogenboom, H. R., y Chiswell, J., eds.), pp. 77-98, IRL Press, Oxford; Y, K., Chung, J., Kim, H., Kim, I., Jung, H., Kim, J., Choi, I., Suh, P., y Chung, H. (1999), Expression and characterization of anti-NCA-95 scFv (CEA 79 scFv) in a prokaryotic expression vector modified to contain a Sfil and NotI site, Hybridoma, 18, 243-249). Brevemente, los pocillos de una placa de 96 pocillos Costar 3690 se revistieron con 250 ng de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en 50 μ l de tampón de metal a 4 °C durante la noche. La placa se lavó cinco veces con agua y se bloqueó con 160 μ l de BSA al 2% en PBS durante 2 horas a 37 °C. El Fab RAD87 o el Fab abciximab purificado se mezcló con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ hasta alcanzar una concentración final de 2×10^{-10} M. Las concentraciones finales de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se ajustaron entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-10} M. Estas mezclas se incubaron durante la noche para permitir alcanzar el equilibrio. Después de lavar brevemente la placa con agua, las mezclas de anticuerpo-antígeno se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con Tween 20 al 0,05% en PBS antes de añadir anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano 200 ng/ml (Pierce). Después de una incubación a temperatura ambiente durante 1 h, la placa se lavó cinco veces con Tween 20 al 0,05% en PBS antes de añadir 50 μ l de disolución de sustrato ABTS (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display:

A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Después de una incubación a 37 °C durante 2 h, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 3 N. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Se trazó una gráfica de Scatchard con $\nu/[Ag]$ en el eje de ordenadas y ν en el eje de abscisas. [Ag] es la concentración del antígeno libre; ν es la fracción del anticuerpo unido, que se obtiene dividiendo la absorbancia en presencia de una concentración definida de antígeno soluble entre la absorbancia en ausencia de antígeno soluble. La pendiente de una línea recta en la gráfica de Scatchard es igual a $1/K_d$.

Generación y selección de un banco de Fab humanos sintéticos/no expuestos híbrido

El objetivo de este estudio es generar anticuerpos humanos sintéticos que discriminan entre la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ y otras integrinas que se unen a RGD, en especial la integrina $\alpha_v\beta_3$, mediante el injerto de un motivo RAD flanqueado en ambos lados por tres restos aminoácidos aleatorizados en HCDR3. En primer lugar, se empleó un motivo RAD, en lugar de un motivo RGD, como secuencia de reconocimiento central. En segundo lugar, se retiró un puente disulfuro CX₉C que rodea a la secuencia de reconocimiento central en ambos estudios previos. En tercer lugar, el banco de HCDR3 sintético se injertó en un banco de VH humano no expuesto amplificado a partir de ADNc de médula ósea humana. Así, además de su aleatorización en HCDR3, se introdujo un segundo nivel de complejidad del banco mediante la diversificación de VH.

Se generó un banco de anticuerpos humanos con la secuencia de HCDR3 aleatorizada VGXXXRADXXXXYAMDV (SEQ ID NO:3), en la que X es cualquiera de los 20 aminoácidos naturales habituales, en el vector de fágido pComb3X. VH, el fragmento que codifica FR1 a FR3 del dominio variable de cadena pesada, se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos del gen de cadena pesada variable humano DP-47 y ADNc de médula ósea humana de seis donantes sanos como molde. Este banco de fragmentos de cadena pesada sintéticos/no expuestos híbrido inicialmente se apareó con una cadena ligera kappa humana DPK-26 previamente seleccionada. El banco de Fab resultante se clonó en el vector de fágido pComb3X, produciendo una complejidad de 1×10^9 transformantes independientes. Clones elegidos de forma aleatoria del banco no seleccionado confirmaron la variedad deseada en secuencias de VH y HCDR3. Después de siete rondas de inmunoadsorción sobre la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ inmovilizada, más del 80% de los clones seleccionados se unían a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$, tal como se analizó mediante ELISA de fagos (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Las secuencias que codifican el fragmento de cadena pesada seleccionadas se sometieron a una segunda etapa de selección basada en la reordenamiento de la cadena ligera. Para esto, la cadena ligera kappa humana DPK-26 fue sustituida por un banco de cadenas ligeras kappa y lambda humanas amplificado a partir de ADNc de médula ósea humana. El banco de cadenas ligeras humanas no expuestas resultante de nuevo se clonó en el vector de fágido pComb3X, produciendo una complejidad de 7×10^8 transformantes independientes. Después de tres rondas de inmunoadsorción sobre la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ humana inmovilizada, todos los clones seleccionados se unían a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$, según se analizó mediante ELISA de fagos.

Diez clones individuales que mostraron la unión más fuerte se analizaron posteriormente mediante secuenciación de ADN. Todos los clones menos uno contenían un bucle constreñido por un puente disulfuro en HCDR3 con la secuencia consenso V (V/W) CRAD (K/R) RC (SEQ ID NO:4) (tabla 2). La excepción, el clon RAD1, tenía la correspondiente secuencia THSRADRRE (SEQ ID NO:1) (tabla 2). Todos los clones mostraron un fragmento de cadena pesada VH DP-47. Mientras que cuatro clones presentaban la cadena ligera kappa humana DPK-26 original, seis clones presentaban cadenas ligeras kappa o lambda humanas derivadas del banco de cadenas ligeras humanas no expuestas.

Caracterización bioquímica y funcional de Fab humanos seleccionados

Se ensayaron Fab expresados a partir de los diez clones seleccionados para determinar su reactividad con integrinas que se unen a RGD mediante ELISA. Todos los Fab se unen con fuerza a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ humana, pero no a las integrinas humanas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, y $\alpha_v\beta_5$ (figura 1). Para comprobar su reactividad hacia la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ nativa expresada sobre la superficie de plaquetas humanas, todos los Fab se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo. Se descubrió que todos los Fab seleccionados se unían a plaquetas humanas, mientras que los Fab irrelevantes no. Puesto que la interacción entre la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ y el fibrinógeno es mediada, en parte, por el motivo RGD, después se ensayó si los Fab seleccionados podían inhibir esta interacción proteína-proteína. Para este objetivo, se estableció un ensayo ELISA competitivo basado en la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ inmovilizada, fibrinógeno biotinilado y avidina-HRP. Los Fab seleccionados se mezclaron con el fibrinógeno biotinilado a diferentes concentraciones y después se incubaron con la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ inmovilizada. Se empleó avidina-HRP para detectar el fibrinógeno biotinilado unido a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ inmovilizada. Todos los Fab seleccionados mostraron una potente inhibición de la interacción de la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ y el fibrinógeno.

Después los inventores se centraron en el Fab RAD87, que demostró la unión más fuerte a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ (figura

1). El Fab RAD87 se expresó en *E. coli* y se purificó como se ha descrito previamente (Barbas, C. F., 3^o, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Tal como reveló una citometría de flujo, el Fab RAD87 se une solo a plaquetas humanas pero no a células HUVEC, que principalmente expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$ (figura 2). Por contraste, el Fab abciximab (ReoPro, Eli Lilly, Indianápolis, IN) se une a las plaquetas y a las células HUVEC (figura 2), lo cual confirma su reactividad cruzada documentada con las dos integrinas β_3 (Bougie, D. W., Wilker, P. R., Wuitschick, E. D., Curtis, B. R., Malik, M., Levine, S., Lind, R. N., Pereira, J., y Aster, R. H. (2002), Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIIa, *Blood*, 100, 2071-2076). El Fab RAD87 bloquea la interacción entre la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y el fibrinógeno de una manera dependiente de la dosis, con una CI_{50} de $8,0 \times 10^{-8}$ M. En un experimento paralelo, el Fab abciximab mostró una CI_{50} de $9,0 \times 10^{-8}$ M (figura 3A, tabla 3). Basándose en un ELISA competitivo (Suzuki, K., Sato, K., Kamohara, M., Kaku, S., Kawasaki, T., Yano, S., e Izumi, Y. (2002), Comparative studies of a humanized anti-glycoprotein IIb/IIIa monoclonal antibody, YM337, and abciximab on in vitro antiplatelet effect and binding properties, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1-006-1012; Co, M. S., Yano, S., Hsu, R. K., Landolfi, N. F., Vasquez, M., Cole, M., Tso, J. T., Bringman, T., Laird, W., Hudson, D., *et al.* (1994), A humanized antibody specific for the platelet integrin gpIIb/IIIa, *J. Immunol.*, 152, 2968-2976), el valor de K_d de la interacción del Fab RAD87 monovalente/integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ era de $3,3 \times 10^{-9}$ M (tabla 3). El mismo ensayo produjo un valor de K_d de $1,1 \times 10^{-9}$ M para la interacción del Fab abciximab monovalente/integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, comparado con el valor publicado de $6,2 \times 10^{-9}$ M (tabla 3) (Tam, S. H., Sassoli, P. M., Jordan, R. E., y Nakada, M. T. (1998), Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha (v) beta3 integrins, *Circulation*, 98, 1085-1091).

Puesto que la interacción entre la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y el fibrinógeno es una etapa fundamental para la agregación plaquetaria, los inventores ensayaron si el Fab RAD87 puede inhibir la agregación plaquetaria *ex vivo*. La agregación plaquetaria fue inducida y controlada mediante un agregómetro plaquetario mediante la adición de ADP hasta una concentración final de 20 μ M a plasma acondicionado preparado a partir de sangre periférica. Se descubrió que el Fab RAD87 inhibía con gran potencia la agregación plaquetaria, con una CE_{50} de 60 nM o 3 μ g/ml (figura 4, tabla 3). En un experimento paralelo, se determinó que la CE_{50} del Fab abciximab era de 45 nM, habiéndose divulgado previamente que era de 34 nM (Klinkhardt, U., Kirchmaier, C. M., Westrup, D., Breddin, H. K., Mahnel, R., Graff, J., Hild, M., y Harder, S. (2000), Differential in vitro effects of the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors abciximab or SR121566A on platelet aggregation, fibrinogen binding and platelet secretory parameters, *Thromb. Res.*, 97, 201-207) cuando la agregación plaquetaria se induce a una concentración de ADP 5 μ M.

Caracterización bioquímica y funcional de péptidos sintéticos derivados de secuencias de HCDR3 seleccionadas

Se sintetizaron de modo químico cuatro nonapéptidos cuyas secuencias se derivaron de las secuencias de HCDR3 seleccionadas del Fab de unión a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Este panel incluye tres péptidos cíclicos, VWCRADKRC (SEQ ID NO:6), VWCRADRRRC (SEQ ID NO:5), y VVCRADRRRC (SEQ ID NO:7), y el péptido lineal THSRADRRRE (SEQ ID NO:19). Utilizando el ensayo de ELISA competitivo descrito anteriormente, se descubrió que todos los péptidos cíclicos inhibían la interacción entre la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y el fibrinógeno en un intervalo de concentración micromolar. El péptido lineal, así como tres péptidos control (dos con un motivo RAD invertido, VVCDARRRC (SEQ ID NO:20) y THSDARRRE (SEQ ID NO:21), y uno con una secuencia no relacionada) no inhibían la interacción proteína-proteína en el mismo intervalo de concentración (figura 3B). Se determinó que la CI_{50} de los péptidos cíclicos más potentes, VWCRADRRRC (SEQ ID NO:5) y VWCRADKRC (SEQ ID NO:6) era de $1,2 \times 10^{-6}$ M y $4,2 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. La CI_{50} del péptido cíclico VVCRADRRRC, cuya secuencia se deriva del Fab RAD87, era de $1,1 \times 10^{-5}$ M, que es dos órdenes de magnitud mayor que la correspondiente CI_{50} obtenida para el Fab RAD87 (figura 3B).

La figura 5 muestra el ensayo de agregación plaquetaria *ex vivo* en presencia de diversas concentraciones de VWCRADRRRC (SEQ ID NO:5) (A), VVCRADRRRC (SEQ ID NO:7) (B), VWCRADKRC (SEQ ID NO:6) (C), y THSDARRRE (SEQ ID NO:19) y los péptidos control (D). De modo sorprendente, los tres péptidos cíclicos, pero no el péptido lineal ni los péptidos control, inhibían completamente la agregación plaquetaria a una concentración de 90 μ M. En correlación con el ensayo de interacción de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ /fibrinógeno, el péptido cíclico VWCRADRRRC (SEQ ID NO:5), el único péptido que inhibe la agregación plaquetaria a una concentración tan baja como 9 μ M (figura 5A), de nuevo demostró ser el inhibidor más potente.

Aunque su aplicación potencial como fármacos antitrombóticos se solapa con el abciximab, los anticuerpos RAD descritos en la presente tienen varias características distintivas. En primer lugar, son anticuerpos humanos, por lo que es menos probable que induzcan una respuesta inmunológica en los pacientes. En segundo lugar, al igual que los peptidomiméticos y péptidos RGD (Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., y Arnaout, M. A. (2002), Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand, *Science*, 296, 151-155), los anticuerpos RAD bloquean directamente el sitio de unión a RGD de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Por contraste, se cree que el mecanismo del acoplamiento de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ por el abciximab,

que no contiene un motivo RGD o similar a RGD, implica un impedimento estérico o alostérico, en lugar de un bloqueo directo del sitio de unión a RGD. En tercer lugar, los anticuerpos RAD se unen selectivamente a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, mientras que el abciximab no diferencia entre las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$. La reactividad cruzada del abciximab es análoga a los anticuerpos sintéticos de unión a integrina previos de los inventores (Barbas, C. F., 3^o, Languino, L. R., y Smith, J. W. (1993), High-affinity self-reactive human antibodies by design and selection: targeting the integrin ligand binding site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10003-10007; Smith, J. W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz-Sweeney, S., y Barbas, C. F., 3^o (1994), Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins, *J. Biol. Chem.*, 269, 32788-32795).

La trombocitopenia aguda cuya causa es desconocida es uno de los principales problemas de seguridad con los inhibidores de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Tal como se mencionó anteriormente, se ha divulgado que los anticuerpos humanos contra los dominios variables de ratón del abciximab son la principal causa de destrucción de plaquetas en pacientes que desarrollan trombocitopenia grave después de haber recibido abciximab por segunda vez (Curtis, B. R., Swyers, J., Divgi, A., McFarland, J. G., y Aster, R. H. (2002), Thrombocytopenia after second exposure to abciximab is caused by antibodies that recognize abciximab-coated platelets, *Blood*, 99, 2054-2059). Este descubrimiento puede hacer necesaria una mayor humanización del abciximab mediante el injerto de sus CDR sobre el marco de dominios variables humanos (Rader, C., Ritter, G., Nathan, S., Elia, M., Gout, I., Jungbluth, A. A., Cohen, L. S., Welt, S., Old, L. J., y Barbas, C. F., 3^o (2000), The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies, *J. Biol. Chem.*, 275, 13668-13676). Sin embargo, si a esto no le acompaña un ajuste fino del marco basado en información estructural detallada del anticuerpo, esta estrategia de injerto de CDR a menudo produce anticuerpos con una afinidad muy reducida por el antígeno, como en el caso del anticuerpo monoclonal anti-integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ YM337, que en la actualidad se está evaluando en ensayos clínicos (Suzuki, K., Sato, K., Kamohara, M., Kaku, S., Kawasaki, T., Yano, S., e Iizumi, Y. (2002), Comparative studies of a humanized anti-glycoprotein IIb/IIIa monoclonal antibody, YM337, and abciximab on in vitro antiplatelet effect and binding properties, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1006-1012; Co, M. S., Yano, S., Hsu, R. K., Landolfi, N. F., Vasquez, M., Cole, M., Tso, J. T., Bringman, T., Laird, W., Hudson, D., *et al.* (1994), A humanized antibody specific for the platelet integrin gpIIb/IIIa, *J. Immunol.*, 152, 2968-2976). Puesto que los anticuerpos RAD están formados enteramente por secuencias humanas, excepto por el HCDR3 sintético, se espera que sean menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos o humanizados. Sin embargo, es posible la inducción de anticuerpos anti-idiotípicos humanos por los anticuerpos RAD de la invención. Puesto que los anticuerpos anti-idiotípicos en la circulación pueden competir con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas por la unión del anticuerpo RAD, es razonable suponer que no provocarán una trombocitopenia grave. Un interesante descubrimiento reciente ha sido que los anticuerpos humanos que reconocen selectivamente la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ cuando forma complejos con el tirofiban y la eptifibatida aparecen en un número muy limitado de pacientes que desarrollan una trombocitopenia grave después de ser tratados con fármacos de molécula pequeña (Bougie, D. W., Wilker, P. R., Wuitschick, E. D., Curtis, B. R., Malik, M., Levine, S., Lind, R. N., Pereira, J., y Aster, R. H. (2002), Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIIa, *Blood*, 100, 2071-2076). En este contexto, sigue siendo posible que los anticuerpos RAD provoquen trombocitopenia mediante la inducción de la presentación de epitopos inmunogénicos sobre la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, puesto que su modo de unión imita a los fármacos de molécula pequeña.

Varios anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón específicos para la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que incluyen LJ-CP3, OPG2, and PAC-1 (Puzon-McLaughlin, W., Kamata, T., y Takada, Y. (2000), Multiple discontinuous ligand-mimetic antibody binding sites define a ligand binding pocket in integrin alpha (IIb) beta (3), *J. Biol. Chem.*, 275, 7795-7802; Kamata, T., Irie, A., Tokuhira, M., y Takada, Y. (1996), Critical residues of integrin alphaIIb subunit for binding of alphaIIb-beta3 (glycoprotein IIb-IIIa) to fibrinogen and ligand-mimetic antibodies (PAC-1, OP-G2, and LJ-CP3), *J. Biol. Chem.*, 271, 18610-18615; Prammer, K. V., Boyer, J., Ugen, K., Shattil, S. J., y Kieber-Emmons, T. (1994), Bioactive Arg-Gly-Asp conformations in anti-integrin GPIIb-IIIa antibodies, *Receptor*, 4, 93-108; Tomiyama, Y., Brojer, E., Ruggeri, Z. M., Shattil, S. J., Smiltneck, J., Gorski, J., Kumar, A., Kieber-Emmons, T., y Kunicki, T. J. (1992), A molecular model of RGD ligands. Antibody D gene segments that direct specificity for the integrin alpha IIb beta 3, *J. Biol. Chem.*, 267, 18085-18092; Niiya, K., Hodson, E., Bader, R., Byers-Ward, V., Koziol, J. A., Plow, E. F., y Ruggeri, Z. M. (1987), Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation, *Blood*, 70, 475-483; Bennett, J. S., Hoxie, J. A., Leitman, S., F., Vilaire, G., y Cines, D. B. (1983), Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2417-2421) contienen un motivo RYD en HCDR3. La unión de estos mAb de ratón a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ puede ser completamente bloqueada por los péptidos RGD, lo cual sugiere que su motivo RYD media en una interacción directa con el sitio de unión de RGD. De modo interesante, el mAb de ratón 16N7C2, que contiene un motivo RGD en HCDR3, no diferencia entre las integrinas β_3 (Deckmyn, H., Stanssens, P., Hoet, B., Declerck, P. J., Lauwereys, M., Gansemans, Y., Tornai, I., y Vermylen, J. (1994), An echistatin-like Arg-Gly-Asp (RGD)-containing sequence in the heavy chain CDR3 of a murine monoclonal antibody that inhibits human platelet glycoprotein IIb/IIIa function, *Br. J. Haematol.*, 87, 562-571). Así, de un modo similar al motivo RAD sintético de los inventores, el motivo RYD nativo, en algunos contextos, proporciona un

reconocimiento selectivo de la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$. Sin embargo, por contraste con los anticuerpos RAD sintéticos, ninguno de LJ-CP3, OPG2, o PAC-1 contiene un puente disulfuro en HCDR3 que muestre un motivo de tipo RGD (Tomiyama, Y, Brojer, E., Ruggeri, Z. M., Shattil, S. J., Smiltneck, J., Gorski, J., Kumar, A., Kieber-Emmons, T., y Kunicki, T. J. (1992), A molecular model of RGD ligands. Antibody D gene segments that direct specificity for the integrin alpha 11b beta 3, J. Biol. Chem., 267, 18085-18092), lo cual sugiere una limitación en la diversidad estructural que puede ser obtenida mediante la recombinación de VDJ o una selección contra los puentes disulfuro en HCDR3. Previamente, los inventores han seleccionado anticuerpos humanos con un motivo RGD o un motivo que imita a RGD sintéticamente injertado en HCDR3 para la unión a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{11b}\beta_3$ (Barbas, C. F., 3º, Languino, L. R., and Smith, J. W. (1993), High-affinity self-reactive human antibodies by design and selection: targeting the integrin ligand binding site, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10003-10007; Smith, J. W., Hu, D., Satterthwait, A., Pinz- Sweeney, S., yd Barbas, C. F., 3º (1994), Building synthetic antibodies as adhesive ligands for integrins, J. Biol. Chem., 269, 32788-32795; Barbas, C. F., 3º (1993), Recent advances in phage display, Curr. Opin. Biotechnol., 4, 526-530). Ninguno de los anticuerpos seleccionados era exclusivamente específico para cualquiera de las integrinas. En un intento de seleccionar anticuerpos con mayor especificidad, los inventores generaron un nuevo banco de anticuerpos humanos sintéticos con la secuencia de HCDR3 aleatorizada VGXXXRADXXXXYAMDV (SEQ ID NO:3). Además de reemplazar el motivo RGD por un motivo RAD, una importante distinción del nuevo banco es la eliminación de un puente disulfuro CX₉C que abarca al motivo de unión a integrina y sus restos flanqueantes en bancos previos. De modo interesante, la selección del nuevo banco contra la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ produce un nuevo puente disulfuro que muestra un motivo del tipo CX₅C que se encuentra en 90% de las secuencias de anticuerpos seleccionadas. Esta estructura de bucle más pequeña, cuya selección dentro del puente disulfuro CX₉C previo hubiera sido muy improbable, o imposible, produce una selectividad excepcional hacia la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$.

Las restricciones estructurales de los motivos XXXRADXXX (SEQ ID NO:22) seleccionados dentro de HCDR3 empujó a los inventores a diseccionarlos del andamiaje del anticuerpo y evaluar sus propiedades funcionales. Tres péptidos sintéticos que muestran el motivo RAD dentro de un puente disulfuro CX₅C, VWCRADRRRC (SEQ ID NO:5), VWCRADKRC (SEQ ID NO:6), y VVCRADRRRC (SEQ ID NO:7), pero no el péptido sintético lineal THSRADRRRC (SEQ ID NO:19), inhiben la unión de los anticuerpos RAD seleccionados a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$, la unión del fibrinógeno a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$, así como la agregación plaquetaria. Se han seleccionado antagonistas peptídicos para la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ a partir de bancos de péptidos mediante presentación de fagos (O'Neil, K. T., Hoess, R. H., Jackson, S. A., Ramachandran, N. S., Mousa, S. A., y DeGrado, W. F. (1992), Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library, Proteins, 14, 509-515; Koivunen, E., Wang, B., y Ruoslahti, E. (1995), Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins, Biotechnology (NY), 13, 265-270; Koivunen, E., Restel, B. H., Rajotte, D., Lahdenranta, J., Hagedom, M., Arap, W., y Pasqualini, R. (1999), Integrin-binding peptides derived from phage display libraries, Methods Mol. Biol., 129, 3-17). Se emplearon bancos de péptidos constreñidos del tipo CX₅C, CX₆C, CX₇C, y CX₉. Sin embargo, sólo los bancos de péptidos CX₆C y CX₇C producen ligantes para la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$. Las secuencias seleccionadas pueden clasificarse en dos grupos: las que contienen un motivo RGD y las que contienen un motivo similar a RGD, en las que el resto glicina o arginina de RGD ha sido reemplazado. La glicina central ha sido sustituida por una diversidad de restos aminoácidos diferentes, tales como serina, treonina, leucina, alanina, glutamina, histidina, y metionina. Dos péptidos, CRADVPLC (SEQ ID NO:23) y CMSRADRPC (SEQ ID NO:24) contienen un motivo RAD. Las secuencias que contienen RGD seleccionadas sobre la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ se diferencian de las seleccionadas sobre la integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ en que sus restos aromáticos Trp, Phe, o Tyr están enriquecidos en la posición inmediatamente C-terminal al motivo RGD. Además, varias secuencias contienen uno o dos restos básicos fuera del motivo RGD. Sin embargo, ninguna de las secuencias peptídicas seleccionadas comparte similitud con las secuencias de HCDR3 seleccionadas por los inventores VWCRADKRC (SEQ ID NO:6), VWCRADRRRC (SEQ ID NO:5), y VVCRADRRRC (SEQ ID NO:7). Nótese el hecho de que el banco de péptidos CX₅C, que incluye la secuencia consenso central CX₅C de los inventores CRAD (K/R) RC, no produce ningún péptido de unión a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$, lo cual sugiere que los restos N-terminales VW o VV en las secuencias de HCDR3 seleccionadas por los inventores desempeñan un papel esencial en la interacción con la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$.

La presentación de fagos de bancos de péptidos y de anticuerpos se ha convertido en una tecnología convencional para una diversidad de aplicaciones en la investigación y el desarrollo (Barbas, C. F., 3º, Burton, D. R., Scott, J. K., y Silverman, G. J. (2001), Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Kay, B. K., Kasanov, J., y Yamabhai, M. (2001), Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries, Methods, 24, 240-246; Sidhu, S. S. (2000), Phage display in pharmaceutical biotechnology, Curr. Opin. Biotechnol., 11, 610-616). La presentación de bancos de péptidos dentro del dominio variable de inmunoglobulinas de anticuerpos fusiona estas tecnologías, proporcionando una conexión intrigante entre el descubrimiento de fármacos de peptidomiméticos, péptidos y anticuerpos. En la presente se demuestra la eficacia de esta estrategia para generar nuevos anticuerpos y péptidos anti-receptor específicos. La colocación de péptidos de unión y/o bioactivos dentro del andamiaje del anticuerpo o su generación dentro del andamiaje prevé el desarrollo rápido de agentes inmunológicos que puedan utilizarse como herramientas biológicas o productos terapéuticos (Barbas, C. F., 3º (1993), Recent advances in phage display, Curr. Opin. Biotechnol., 4, 526-530). A

5 menudo, los propios péptidos tienen una actividad comprometida *in vivo* y su unión es difícil de controlar, aunque su presentación dentro del contexto de un anticuerpo soluciona los problemas de detección, así como los problemas asociados con la proteólisis de péptidos y su rápida eliminación, puesto que los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos muestran un comportamiento farmacocinético relativamente predecible. Cuando se desee, por ejemplo, en un entorno de cáncer, la región Fc del anticuerpo puede conferir propiedades de destrucción celular a la secuencia peptídica como resultado del acoplamiento de un efector inmunológico. Los inventores creen que esta estrategia puede aplicarse a una amplia gama de péptidos con actividad de unión para generar con rapidez reactivos inmunológicos útiles (Brown, K. C. (2000), *New approaches for cell-specific targeting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4,16-21).

10 Tabla 1. Secuencias de HCDR3 procedentes de bancos de anticuerpos humanos sintéticos seleccionados contra integrinas β_3

Fab anti-gp120	VGP YSW DDS PDQ NYMDV
Banco de Fab ^a	VGC XXX RGD XXX CYYMDV
Fab-4	--- TGQ --- WRS -----
Fab-7	--- TYG --- TRN -----
Fab-8	--- PIP --- WRE -----
Fab-9	--- SFG --- IRN -----
Fab-10	--- TMG --- ERN -----
Fab-9	VGC SFG RGD IRN CYYMDV
Banco de MTF ^b	VGC SFG XXX XRN CYYMDV
MTF-2	--- --- RTD Q-I -----
MTF-10	--- --- KGD N-I -----
MTF-32	--- --- RRD E-- -----
MTF-40	--- --- RND S-- -----
MTF-1	--- --- RVD D-- -----
MTF-12	--- --- RAD R-- -----
MTF-15	--- --- RSV D-- -----
MTF-7	--- --- KRD M-- -----
MTF-13	--- --- RWD A-- -----
MTF-14	--- --- RQD V-- -----
MTF-20	--- --- RDD G-- -----
Banco de RAD	VR XXX RAD XXX YAMDV
^a Barbas <i>et al.</i> (18); ^b Smith <i>et al.</i> (19)	

Tabla 2. Secuencias de RAD del banco de Fab seleccionadas contra la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

Fab	VH	HCDR3		VL
RAD1	VH3 DP-47	VR <u>THSRAD</u> <u>RRE</u> YRMDV	VKIII	DPK22/A27
RAD3	VH3 DP-47	VR <u>VVCRAD</u> <u>RRC</u> YAMDV	VKVI	DPK26/A26

ES 2 436 170 T3

RAD4	VH3 DP-47	VG <u>V</u> W <u>C</u> RAD <u>R</u> R <u>C</u> YRMDV	VKVI	DPK26/A26
RAD9	VH3 DP-47	VR <u>V</u> V <u>C</u> RAD <u>R</u> R <u>C</u> YAMDV	VKIII	Vg/38K
RAD11	VH3 DP-47	VG <u>V</u> W <u>C</u> RAD <u>R</u> R <u>C</u> YAMDV	VkVI	DPK26/A26
RAD12	VH3 DP-47	VR <u>V</u> V <u>C</u> RAD <u>R</u> R <u>C</u> YAMDV	VL8	8a.88E1/DPL21
RAD32	VH3 DP-47	VG <u>V</u> W <u>C</u> RAD <u>K</u> R <u>C</u> YAMDV	VKIII	3A9
RAD34	VH3 DP-47	VR <u>V</u> V <u>C</u> RAD <u>R</u> R <u>C</u> YAMDV	VL3	V2-14
RAD87	VH3 DP-47	VG <u>V</u> V <u>C</u> RAD <u>R</u> R <u>C</u> YAMDV	VL2	2c.118D9/v1-2
RAD88	VH3 DP-47	VR <u>V</u> W <u>C</u> RAD <u>K</u> R <u>C</u> YAMDV	VKVI	DPK26/A26

Tabla 3. Comparación del Fab RAD87 y Fab abciximab

Fab	K_d^a	CI_{50}^b	CE_{50}^c
RAD87	$3,3 \times 10^{-9}$ M	$8,0 \times 10^{-8}$ M	60 nM
Abciximab	$1,1 \times 10^{-9}$ M	$9,0 \times 10^{-8}$ M	45 nM

^a Constante de disociación para la unión de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana.

^b Concentración requerida para 50% de inhibición en un ensayo de interacción del fibrinógeno humano y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana.

^c Concentración requerida para 50% de inhibición en un ensayo de agregación de plaquetas humanas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Scripps Research Institute

<120> ANTICUERPOS Y PÉPTIDOS ESPECÍFICOS DE LA INTEGRINA ALFA.IIb.BETA.3.

<130> 12142 EP PAB

5 <140> documento EP 04812819.3

<141> 03-12-2004

<150> documento US 60/526.859

<151> 03-12-2003

10 <150> documento PCT/US2004/040381

<151> 2004-12-03

<160> 72

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Parte de HCDR3

<400> 1

Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Cys
1 5 10

20 <210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Parte de HCDR3

<400> 2

Gly Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Gly
1 5 10

30 <210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> VARIANTE

<222> (3, 4, 5, 9, 10, 11)

<223> codificado por una secuencia de ADN aleatorizada: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr

40 <400> 3

Val Gly Xaa Xaa Xaa Arg Ala Asp Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Parte consenso de HCDR3

5

<400> 4

Val Val Cys Arg Ala Asp Lys Arg Cys
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Parte consenso de HCDR3

15

<400> 5

Val Trp Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Parte consenso de HCDR3

<400> 6

Val Trp Cys Arg Ala Asp Lys Arg Cys
1 5

25

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Parte consenso de HCDR3

<400> 7

Val Val Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
1 5

<210> 8

35

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Parte consenso de CDR

<400> 8

Val Arg Val Val Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 9

45

<211> 72

<212> ADN

ES 2 436 170 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>

5 <221> característica_misc
 <222> (25, 26, 28, 29, 31, 32, 43, 44, 46, 47, 49, 50)
 <223> cebador neo-rad-f; codificado por la secuencia de ADN aleatorizada: a, g, c, t

<220>
 10 <221> característica_misc
 <222> (27, 30, 33, 45, 48, 51)
 <223> cebador neo-rad-f; codificado por la secuencia de ADN aleatorizada: g, t

<400> 9
gtgtattact gtgcgagagt ggggnknknk nnkcgcgccg acnnknknkn ktacgctatg 60
gacgtctggg gc 72

15 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador dpseq

<400> 10

25 agaagcgtag tccggaacgt c 21

<210> 11
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador DP-47N-term

<400> 11

35 gctgcccaac cagccatggc cgaggtgcag ctgtggagt ctgggggagg cttgta 57

<210> 12
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> cebador DP-47FR3

<400> 12

cactctcgca cagtaataca cggccgtgtc ctggctct 39

50 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador lead-VH

<400> 13

ES 2 436 170 T3

	ggccatggct gttgggcag c	21
5	<210> 14 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador dp-EX <400> 14	
	gaggaggagg aggaggagag aagcgtagtc cggaacgtc	39
15	<210> 15 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador ompseq <400> 15	
25	aagacagcta tcgcgattgc agtg	24
30	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador leadB <400> 16	
	ggccatggct gttgggcag c	21
40	<210> 17 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador RSC-F <400> 17	
	gaggaggagg aggaggagc ggggccagg cgccgagct c	41
50	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador lead-B <400> 18	
60	ggccatggct gttgggcag c	21

Cys Arg Ala Asp Val Pro Leu Cys

1

5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido con el motivo RAD

<400> 24

Cys Met Ser Arg Ala Asp Arg Pro Cys
1 5

10

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> parte consenso de CDR

<400> 25

Val Arg Val Val Cys Arg Ala Asp Lys Arg Cys Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15
Val

20

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> parte consenso de CDR

<400> 26

Val Arg Val Trp Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15
Val

30

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> parte consenso de CDR

<400> 27

Val Arg Val Trp Cys Arg Ala Asp Lys Arg Cys Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15
Val

40

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> parte consenso de CDR

5 <400> 28

Val₁ Gly Val Val Cys₅ Arg Ala Asp Arg Arg₁₀ Cys Tyr Ala Met Asp₁₅
Val

<210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Parte consenso de CDR

<400> 29

Val₁ Gly Val Val Cys₅ Arg Ala Asp Lys Arg₁₀ Cys Tyr Ala Met Asp₁₅
Val

15 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> parte consenso de CDR

<400> 30

Val₁ Gly Val Trp Cys₅ Arg Ala Asp Arg Arg₁₀ Cys Tyr Ala Met Asp₁₅
Val

25 <210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> parte consenso de CDR

<400> 31

Val₁ Gly Val Trp Cys₅ Arg Ala Asp Lys Arg₁₀ Cys Tyr Ala Met Asp₁₅
Val

35 <210> 32
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <223> parte de RAD87

<400> 32

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

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

<210> 33
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> parte de RAD9

<400> 33

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

10 <210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <223> parte de RAD12

<400> 34

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

<210> 35
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> parte de RAD34

<400> 35

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

10 <210> 36
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <223> parte de RAD3

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> parte de RAD32

<400> 37

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

10 <210> 38
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <223> parte de RAD88

<400> 38

<210> 39

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

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<220>

<223> parte de RAD1

<400> 39

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

Asp	Arg	Arg	Glu	Tyr	Ala	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				110					115				

10 <210> 40

<211> 3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<223> motivo RGD

<400> 40

Arg Gly Asp
1

20 <210> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> motivo RAD

5 <400> 41
Arg Ala Asp
 1

<210> 42
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <223> motivo RYD

<400> 42
Arg Tyr Asp
 1

15 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> parte de RAD1

<400> 43
Thr His Ser Arg Ala Asp Arg Arg Glu
 1 5

25 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> parte de RAD3

<400> 44
Thr His Ser Arg Ala Asp Arg Arg Glu
 1 5

35 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <223> parte de RAD4

<400> 45
Val Trp Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
 1 5

45 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de RAD9

Val Val Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
1 5

<400> 46
 <210> 47
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <223> parte de RAD11

<400> 47
Val Trp Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
1 5

<210> 48
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> parte de RAD12

<400> 48
Val Val Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
1 5

<210> 49
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> parte de RAD32

<400> 49
Val Trp Cys Arg Ala Asp Lys Arg Cys
1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> parte de RAD34

<400> 50
Val Val Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> parte de RAD87

<400> 51

Val Val Cys Arg Ala Asp Arg Arg Cys
1 5

<210> 52

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> parte de RAD88

<400> 52

Val Trp Cys Arg Ala Asp Lys Arg Cys
1 5

<210> 53

<211> 18

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de Fab anti-gp120

Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Asp Gln Asn Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

20 <400> 53

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4, 5, 6, 10, 11, 12)

30 <223> parte del banco de Fab; Ala, cys, Asp, Glu, Phe Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr

<400> 54

Val Gly Cys Xaa Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Xaa Xaa Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 55

<211> 18

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de Fab-4

40

<400> 55

Val Gly Cys Thr Gly Gln Arg Gly Asp Trp Arg Ser Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de Fab-7

5

<400> 56

Val Gly Cys Thr Tyr Gly Arg Gly Asp Thr Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de Fab-8

Val Gly Cys Pro Ile Pro Arg Gly Asp Trp Arg Glu Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

15 <400> 57

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<220>

<223> parte de Fab-9

Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ile Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<400> 58

25 <210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<223> parte de Fab-10

<400> 59

Val Gly Cys Thr Trp Gly Arg Gly Asp Glu Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 60

35 <211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

40 <221> VARIANTE

<222> (7,8 9,10)

<223> parte del banco de MTF; Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr

45 <400> 60

Val Gly Cys Ser Phe Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 61
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> parte de MTF-2

10 <400> 61
Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Thr Asp Gln Arg Ile Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 62
 <211> 18
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> parte de MTF-10

<400> 62
Val Gly Cys Ser Phe Gly Lys Gly Asp Asn Arg Ile Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

20 <210> 63
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <223> parte de MTF-32

<400> 63
Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Arg Asn Glu Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

30 <210> 64
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> parte de MTF-40

<400> 64
Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Asn Asp Ser Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

40 <210> 65
 <211> 18
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de MTF-1

5

<400> 65

Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Val Asp Asp Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de MTF-12

15

<400> 66

Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Ala Asp Arg Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> parte de MTF-15

<400> 67

Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Ser Val Asp Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

25 <210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<223> parte de MTF-7

<400> 68

Val Gly Cys Ser Phe Gly Lys Arg Asp Met Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 69

35 <211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

40 <223> parte de MTF-13

<400> 69

Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Trp Asp Ala Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 70
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> parte de MTF-14

10 <400> 70

Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Gln Asp Val Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 71
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> parte de MTF-20

<400> 71

Val Gly Cys Ser Phe Gly Arg Asp Asp Gly Arg Asn Cys Tyr Tyr
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3, 4, 5, 9, 10, 11)
 <223> parte del banco de RAD; Ala, Cys, Asp, Glu, Phe Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr

25

30

<400> 72

Val Arg Xaa Xaa Xaa Arg Ala Asp Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15
Val

REIVINDICACIONES

- 1.- Un péptido aislado y purificado que comprende de 9 a aproximadamente 50 restos aminoácidos, y que tiene una secuencia de restos aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 5, 6 y 7, que tiene una actividad que inhibe la agregación plaquetaria.
- 5 2.- El péptido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de restos aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:5-7.
- 3.- El péptido de la reivindicación 2, que consiste en cualquiera de SEQ ID NO:5-7.
- 4.- El péptido de la reivindicación 2, que consiste fundamentalmente en cualquiera de SEQ ID NO:5-7.
- 10 5.- Un anticuerpo que inmunorreacciona específicamente con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y que comprende una secuencia de restos aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31, en el que la secuencia de restos aminoácidos está dentro de la región determinante de la complementariedad HCDR3 del anticuerpo.
- 6.- El anticuerpo de la reivindicación 5, seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 i) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VRVVCRADRRRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VKVI DPK26/A26;
- ii) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VGVWCADRRRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VKVI DPK26/A26;
- iii) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VRVVCRADRRRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VKIII Vg/38K;
- 20 iv) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VGVWCADRRRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VkVI DPK26/A26;
- v) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VRVVCRADRRRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VL8 8a.88E1/DPL21;
- 25 vi) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VGVWCADKRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VKIII 3A9;
- vii) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VRVVCADRRRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VL3 V2-14;
- viii) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VGVWCADRRRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VL2 2c.118D9/v1-2; y
- 30 ix) un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende VH3 DP-47, una HCDR3 que comprende la secuencia VRVWCADKRCYAMDV, y un dominio VL que comprende VKVI DPK26/A26;
- y que presenta inmunorreactividad con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.
- 7.- El anticuerpo de la reivindicación 5 que es un anticuerpo humano.
- 8.- Un anticuerpo que tiene la inmunorreactividad del anticuerpo de la reivindicación 6.
- 35 9.- Un péptido de la reivindicación 1 o un anticuerpo de la reivindicación 5, para su uso como medicamento.
- 10.- Un anticuerpo de la reivindicación 5 para su uso como medicamento para un tratamiento para prevenir la trombosis.
- 11.- Un anticuerpo que tiene actividad de unión a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, en el que la unión compite con la actividad de unión de otro anticuerpo, comprendiendo el otro anticuerpo una secuencia de restos aminoácidos dentro de una

región determinante de la complementariedad del otro anticuerpo, en el que la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31, y en el que la unión se realiza en un ensayo de competición convencional.

- 5 12.- Un polinucleótido aislado y purificado que codifica un péptido que comprende de 9 a aproximadamente 50 restos aminoácidos, y que tiene una secuencia de restos aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 5, 6 y 7, y el péptido tiene una actividad que inhibe la agregación plaquetaria.
- 13.- Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12.
- 14.- Una célula hospedante que comprende el vector de la reivindicación 13.
- 15.- Un procedimiento de uso de un polinucleótido para producir una proteína, comprendiendo el procedimiento:
- 10 a) cultivar la célula hospedante de la reivindicación 14 bajo condiciones para la expresión de proteínas; y
- b) recuperar la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 5, 6 y 7 a partir del cultivo de células hospedantes.
- 15 16.- Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la reivindicación 1 o el anticuerpo de la reivindicación 5 o la reivindicación 11, y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en una forma adecuada para la administración por vía intravenosa, intraarterial, en la circulación linfática, intraperitoneal, transdérmica, subcutánea, intramuscular, en el espacio articular, o mediante administración pulmonar.
- 17.- Un anticuerpo según la reivindicación 11 para su uso como medicamento.
- 20 18.- Un péptido según la reivindicación 1 o un anticuerpo de la reivindicación 5 o la reivindicación 11, para su uso como medicamento para un tratamiento para prevenir la trombosis en trastornos seleccionados del grupo que consiste en embolia pulmonar, ataques isquémicos transitorios (TIA), trombosis de venas profundas, cirugía de bypass coronario, y cirugía para insertar una válvula o un vaso prostético en un injerto de vasos autólogo, no autólogo o sintético.
- 25 19.- Un péptido según la reivindicación 1 o un anticuerpo de la reivindicación 5 o la reivindicación 11, para su uso como medicamento para un tratamiento para prevenir la trombosis en un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en procedimientos de angioplastia realizados con balón, aterectomía coronaria y angioplastia de láser.

Fig.1

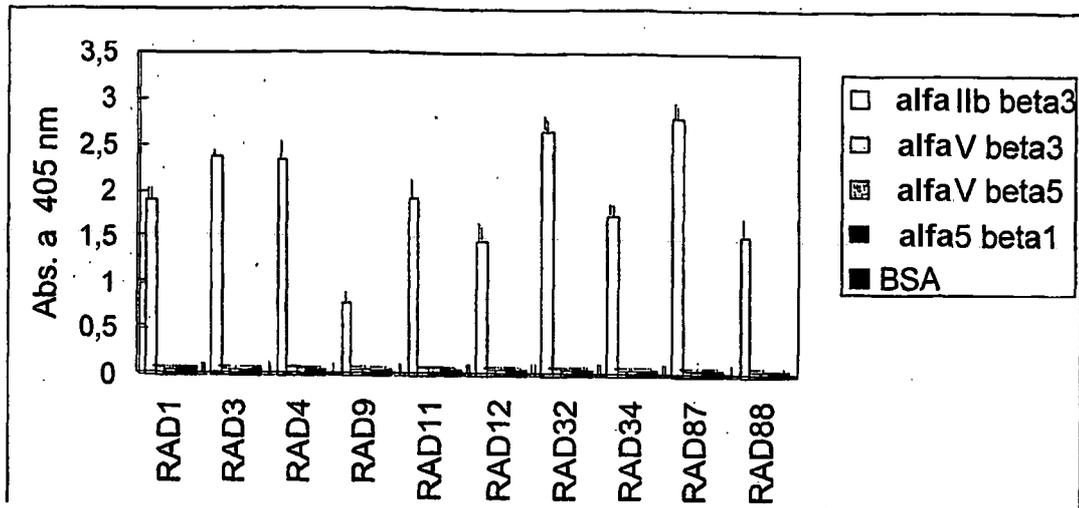


Fig. 2

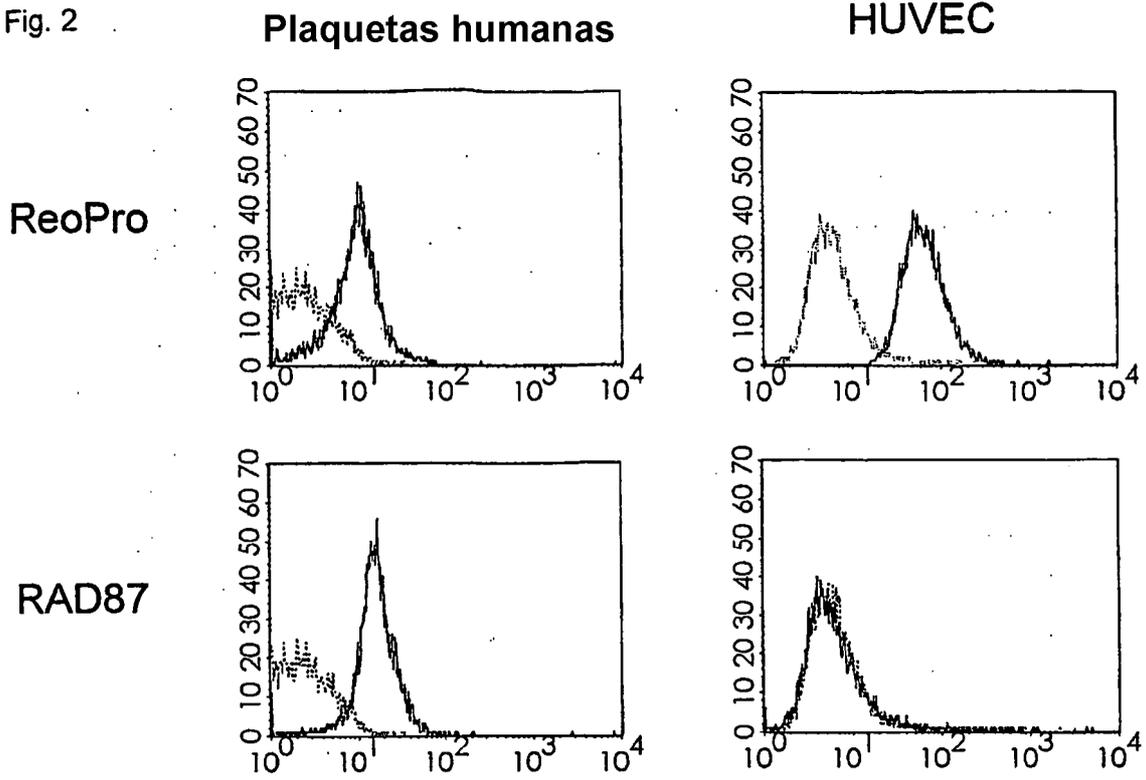
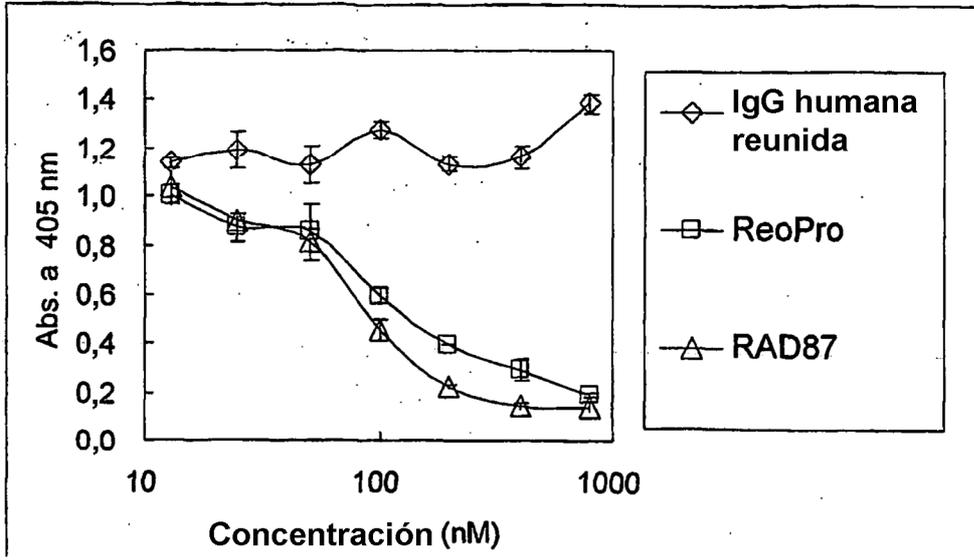


Fig.3

A



B

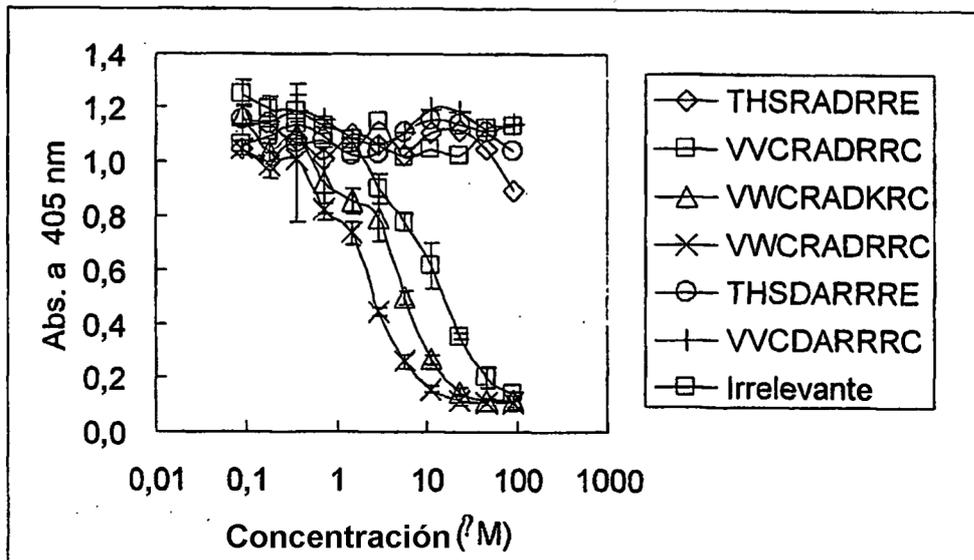
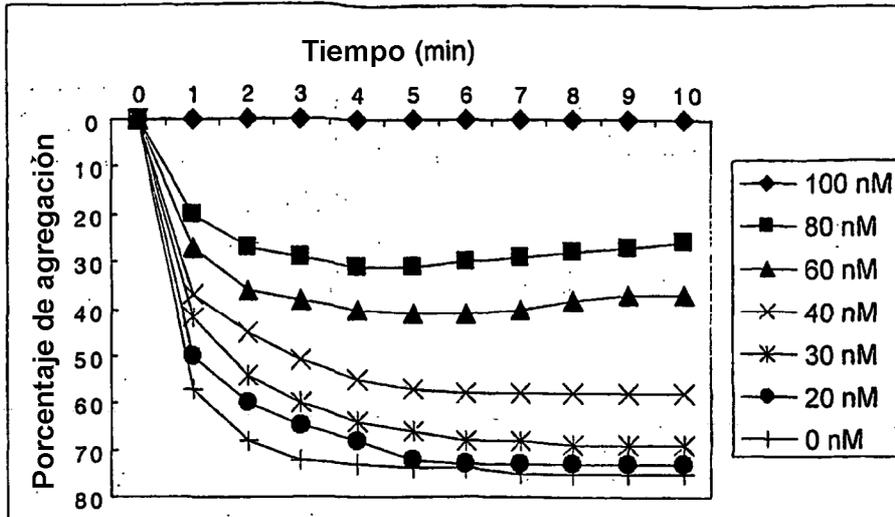
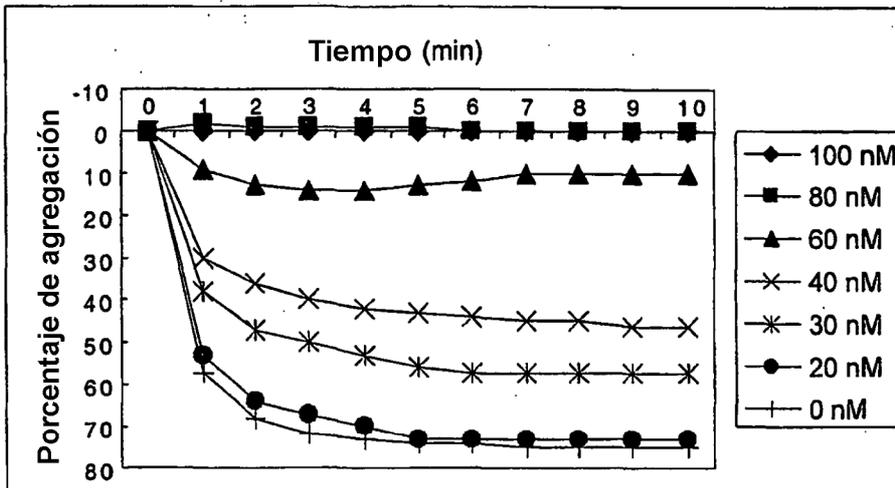


Fig.4

A



B



C

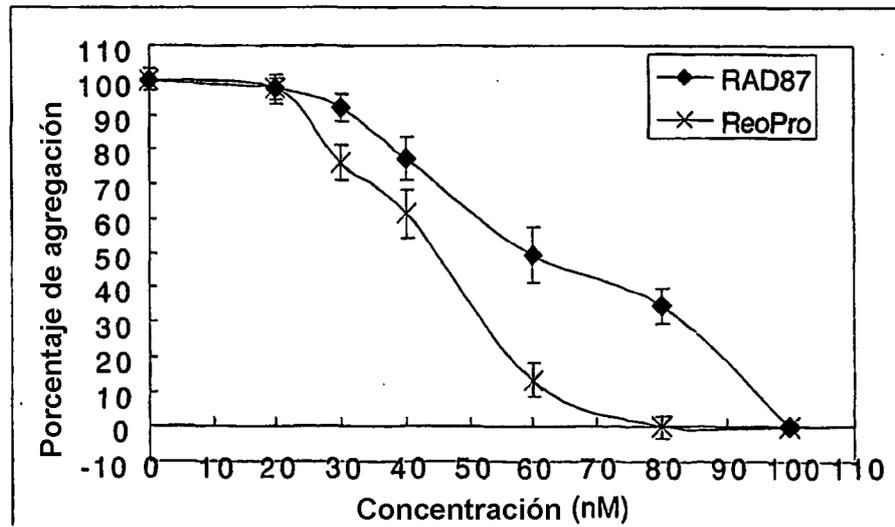
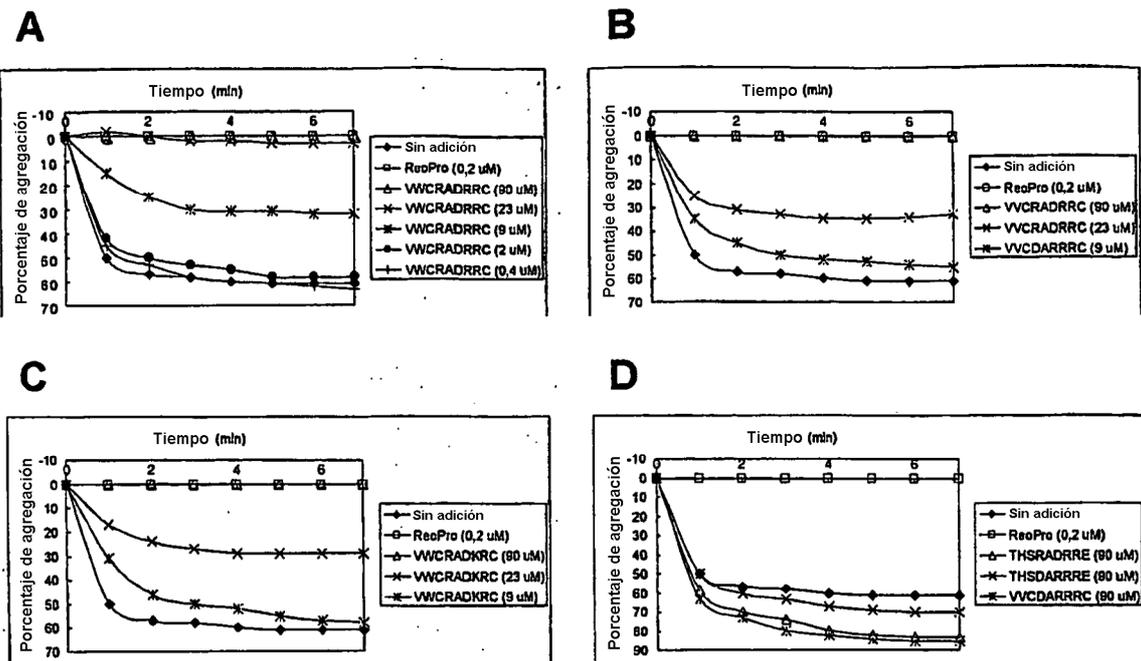


Fig.5



V _H	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4						
1	30	31	35	36	49	50	65	66	97	98	113	114	118
RAD87	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFS	SYAMH	WVRAQPKGLEWVS	AIGTGGG	TYVADSVK	RFTISRDNAKNSLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR	VRVVCRRDRRCYAMDV	WGQGT					
RAD9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFS	SYAMH	WVRAQPKGLEWVS	AIGTGGG	TYVADSVK	RFTISRDNAKNSLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR	VRVVCRRDRRCYAMDV	WGQGT					
RAD12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFS	SYAMH	WVRAQPKGLEWVS	AIGTGGG	TYVADSVK	RFTISRDNAKNSLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR	VRVVCRRDRRCYAMDV	WGQGT					
RAD34	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFS	SYAMH	WVRAQPKGLEWVS	AIGTGGG	TYVADSVK	RFTISRDNAKNSLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR	VRVVCRRDRRCYAMDV	WGQGT					
RAD3	EVQLLESGGGLVHPGGSLRLSCAAGGFTFS	SYAMH	WVRAQPKGLEWVS	AIGTGGG	TYVADSVK	RFTISRDNKSQSTAYLIQINSLRAEDTAVYYCAR	VGWVCRRDRRCYAMDV	WGQGT					
RAD32	EVQLLESGGGLVHPGGSLRLSCAAGGFTFS	SYAMH	WVRAQPKGLEWVS	AIGTGGG	TYVADSVK	RFTISRDNKSQSTAYLIQINSLRAEDTAVYYCAR	VGWVCRRDRRCYAMDV	WGQGT					
RAD88	EVQLLESGGGLVHPGGSLRLSCAAGGFTFS	SYAMH	WVRAQPKGLEWVS	AIGTGGG	TYVADSVK	RFTISRDNKSQSTAYLIQINSLRAEDTAVYYCAR	VGWVCRRDRRCYAMDV	WGQGT					
RAD1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFS	FYGMS	WVRAQPKGLEWVS	GVSSSGITTYAASVRG	RFTISRDNKSQSTAYLIQINSLRAEDTAVYYCAR		VRTHSRDRRCYAMDV	WGQGT					

Figura 6