

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 939**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2010 PCT/US2010/050873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO2011041518**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2010 E 10821238 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2483416**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales**

30 Prioridad:

02.10.2009 US 248014 P

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

02.06.2017

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)

1111 Franklin Street, 12th Floor

Oakland, CA 94607, US

72 Inventor/es:

AKASSOGLU, KATERINA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 939 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 monoclonales

Campo

5 Esta invención se refiere en general a la generación de anticuerpos monoclonales y, en particular, a anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio de fibrina γ C, y a los anticuerpos monoclonales para empleo como agentes terapéuticos.

Introducción

10 Se produce esclerosis múltiple cuando el sistema inmunitario ataca el cerebro y la médula espinal, dañando la mielina que aísla y protege las fibras nerviosas. Las células del cerebro conocidas como microglía participan en este ataque y se activan cuando se rompe la barrera hematoencefálica (BHE), revestimiento de las células que deben proteger el cerebro de intrusos. A medida que se rompe la BHE, una proteína de la sangre llamada fibrinógeno se filtra en el cerebro. Además de su función conocida en la coagulación de la sangre, el fibrinógeno activa los microglíocitos y por lo tanto aumenta la respuesta inflamatoria en modelos animales de esclerosis múltiple. Además, se ha determinado que el fibrinógeno interviene en la patogenia de determinados tipos de cáncer, artritis reumatoide y otras enfermedades y patologías en las que se produce daño hístico por donde "fuga" el fibrinógeno. Véase, p. ej., Akassoglou *et al.*, 2002, *Neuron*, 33:861-875; Akassoglou *et al.*, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:6.698-6.703; Adams *et al.*, 2007, *J. Exp. Med.*, 35:2428-34. Además se ha determinado que el receptor específico, Mac-1, que utiliza fibrinógeno para mediar estos efectos no interviene en las propiedades beneficiosas de coagulación de fibrinógeno. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de los inhibidores específicos de la unión fibrinógeno/Mac-1 se han desarrollado.

Adams *et al.* (*The Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, nº 3, 19 de marzo de 2007, págs. 571-582) describen el péptido $\gamma^{377-395}$ derivado de fibrina que inhibe la activación de la microglía y suprime la parálisis recurrente en enfermedades autoinmunitarias del sistema nervioso central.

25 Ryu *et al.* (*Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 13, nº 9A, septiembre de 2009, págs. 2911-2925) describen la función de la rotura de la barrera hematoencefálica y la infiltración de fibrinógeno en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Según Ryu *et al.*, Un anticuerpo anti-Mac-1 dirigido contra antígenos CD11b bloquea la activación de la microglía, por lo que confiere significativa neuroprotección.

30 Ryu *et al.* (*Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, supl. 1, julio de 2009, págs. 151-154) se refiere a la transducción de la señal de fibrinógeno en el sistema nervioso y especialmente que el direccionamiento farmacológico de las interacciones de fibrinógeno con sus receptores del sistema nervioso podría proporcionar nuevas estrategias para la intervención terapéutica en enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas. Ryu *et al.* describen además que el fibrinógeno reconoce CD11b por la secuencia $\gamma^{377-395}$ del terminal C, que es un epítipo de unión críptica de la molécula de fibrinógeno expuesta solamente después de su polimerización a fibrina o su inmovilización en un sustrato.

35 El documento US 2009/0221507 A1 describe la función inhibidora del péptido $\gamma^{377-395}$ en la activación de la microglía y su utilización para el tratamiento de trastornos degenerativos del sistema nervioso. Además se mencionan anticuerpos anti- $\gamma^{377-395}$.

Altieri *et al.* (*The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, nº 3, 25 de enero de 1993, págs. 1847-1853) describen anticuerpos antifibrinógeno dirigidos contra la región 95-264 de la cadena γ .

40 Por lo tanto, lo que se necesita son inhibidores específicos de la unión fibrinógeno/Mac-1 que reduzcan los efectos proinflamatorios de fibrinógeno en el cerebro y en otra parte en un sujeto, mientras que al mismo tiempo retengan los efectos beneficiosos del fibrinógeno en la coagulación de la sangre.

Compendio

45 La presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de la fibrina o al dominio γ C del fibrinógeno, en donde dicho anticuerpo comprende, individualmente, una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con las secuencias que incluyen RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. nº 2), QMSNLAS (SEQ. ID. nº 3) y AQNLELPLT (SEQ. ID. nº 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias de GYTFTSYWIH (SEQ. ID. nº 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. nº 7) y SDPTGC (SEQ. ID. nº 8); en donde el anticuerpo tiene una capacidad para inhibir la unión de Mac-1 a la fibrina o fibrinógeno, y en donde el anticuerpo suprime los síntomas clínicos de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en el momento de la recaída. En determinados aspectos de la invención, las exposiciones de anticuerpos mayor del 20% de inhibición de adhesión de la microglía al dominio γ C

de la fibrina o del fibrinógeno. En otro aspecto, el anticuerpo presenta más del 50% de inhibición de la unión de Mac-1 al dominio γ C de la fibrina o el fibrinógeno.

En diversas realizaciones, el anticuerpo se une a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ del dominio γ C de fibrina o fibrinógeno. Además se describe un anticuerpo que se puede unir a un epítipo de $\gamma^{190-202}$ del dominio γ C de fibrina o fibrinógeno. Dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales, y, en diversos aspectos anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos.

En diversos aspectos de la invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que incluye RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4). En diversos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que incluye GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7), y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8). En determinados casos, el anticuerpo comprende una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que incluye RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que incluye GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7), y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8).

En diversos aspectos, los anticuerpos anteriores comprenden una secuencia de SEQ. ID. n° 1 de aminoácidos de la cadena ligera variable. En diversos aspectos, los anticuerpos anteriormente comprenden una secuencia de SEQ. ID. n° 5 de aminoácidos variable de la cadena pesada. En aún otro aspecto, los anticuerpos anteriormente comprenden tanto una secuencia de SEQ. ID. n° 1 de aminoácidos variable de la cadena ligera y una secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada de la SEQ. ID. n° 5.

En aún otro aspecto de la presente invención, los anticuerpos anteriores comprenden, cada uno, una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias como por ejemplo RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias como por ejemplo GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7), y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8); y en donde los dominios de la complementariedad de la cadena ligera y dominios de la complementariedad de la cadena pesada conservan la capacidad de unión de Mac-1.

En aún otro aspecto de la presente invención, los anticuerpos anteriores comprenden, cada uno, una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con las secuencias como por ejemplo RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con las secuencias como por ejemplo GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7), y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8); y en donde los dominios de complementariedad de la cadena ligera y los dominios de complementariedad de la cadena pesada conservan capacidad de unión de Mac-1.

En aún otro aspecto de la presente invención, los anticuerpos anteriores comprenden, cada uno, una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias como por ejemplo RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias como por ejemplo GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7), y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8); y en donde los dominios de la complementariedad de la cadena ligera y los dominios de la complementariedad de la cadena pesada conservan capacidad de unión de Mac-1.

También se proporciona el anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una patología relacionada con el enlace de Mac-1 a la fibrina o el enlace de Mac-1 al fibrinógeno, en donde dicha patología se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cicatrización de heridas, isquemia pulmonar, lesión de la médula espinal, la enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, artritis reumatoide y cáncer, preferiblemente en seres humanos.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, se proporciona un equipo que comprende los anticuerpos anteriores e instrucciones para usar el equipo para detectar fibrina en una muestra. Además se describe un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina, CKKTTMKIIPFNRLTIG

(SEQ. ID. nº 18), o uno de sus derivados biológicamente activos. Además se describe una célula que comprende el vector.

Además se describe un método para generar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina, o a uno de sus derivados biológicamente activo, comprendiendo el método: administrar a un sujeto una primera dosis de la célula descrita anteriormente, en donde la primera dosis es suficiente para generar una respuesta inmunitaria en dicho sujeto. El método puede comprender además la etapa de administrar a dicho sujeto una segunda dosis de dicha célula, en donde dicha segunda dosis es suficiente para generar una respuesta inmunitaria en dicho sujeto. El anticuerpo producido inhibe la unión fibrina/Mac-1 en dicho sujeto.

Además se describe un método para la identificación sistemática de un ligando que se une un receptor Mac-1 y modula la actividad del receptor Mac-1, comprendiendo el método: (a) proporcionar el anticuerpo de la reivindicación 1; (b) poner en contacto un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina, CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ. ID. nº 18), o uno de sus derivados biológicamente activo, y formar un complejo anticuerpo/polipéptido; (c) poner en contacto el complejo anticuerpo/polipéptido con una composición que comprende un compuesto experimental; y (d) determinar si el compuesto experimental se une al anticuerpo monoclonal; por lo cual, la unión del compuesto experimental indica que dicho compuesto experimental es un ligando que modula la actividad del receptor Mac-1.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de las presentes enseñanzas se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

Dibujos

Figura 1. Unión de anticuerpo monoclonal evaluada por mediciones de absorbancia a 595 nm en comparación con anticuerpo bloqueador contra Mac-1 (M1/70) disponible en el mercado.

Figura 2. Resultados de ELISA que miden la unión del anticuerpo monoclonal al fibrinógeno.

Figura 3. El anticuerpo monoclonal 5B8 contra el epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina modificado presenta aumento de eficacia en la inhibición de la fagocitosis.

Figura 4. Experimentos *in vivo* de administración de anticuerpos anti-fibrina en PLP EAE después de la primera incidencia de síntomas clínicos relacionados con anticuerpos (A) 4E11 y (B) 5B8. El anticuerpo monoclonal 5B8 presenta supresión en el momento de recaída.

Descripción detallada

Abreviaturas y Definiciones

A menos que se defina de otra manera, los términos científicos y técnicos empleados en relación con la presente invención tendrán los significados que los expertos en la técnica entienden normalmente. Además, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular e histórico, biología molecular, y química de proteínas y oligonucleótidos o polinucleótidos e hibridación descritas en la presente memoria son bien conocidas y normalmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas habituales para ADN recombinado, síntesis de oligonucleótidos, cultivo histórico y transformación celular. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo utilizando equipos disponibles en el mercado según las especificaciones del fabricante o como se realizan normalmente en la técnica o como se describen en la presente memoria.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas biotecnológicas), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (p. ej. Sopherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita *et al.*, eds., J. B. Lippincott Company, 1993).

Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de producción de anticuerpos, producción de hibridomas, química analítica, química orgánica de síntesis y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente memoria son las bien conocidos y normalmente utilizadas en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de los pacientes.

Tal como se utiliza según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique de otra manera, se entenderá que tienen los siguientes significados:

Anticuerpo: Como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un punto de unión al antígeno que une inmunológicamente a un antígeno. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, híbridos, dAb (anticuerpo de dominio), monocatenario, fragmentos F_{ab} , $F_{ab'}$ y $F_{(ab')_2}$, fragmentos F_v monocatenarios (scFv), y una biblioteca de expresión de F_{ab} . La unidad estructural básica del anticuerpo se sabe que comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpos obtenidos de seres humanos se refieren a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren unas de otras por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Determinadas clases también tienen subclases tales como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en los seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

Anticuerpo Monoclonal: La expresión "anticuerpo monoclonal" (MAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una población de anticuerpos que contienen sólo una especie que consiste en un producto génico de la cadena ligera único y un producto de gen de la cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (RDC) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen un punto de unión al antígeno capaz de unirse inmunológicamente a un epítipo determinado del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única para él.

Punto de unión al antígeno/Parte de unión: La expresión "punto de unión al antígeno" o "parte de unión" se refiere a la parte de la molécula de anticuerpo que participa en la unión al antígeno. El punto de unión de antígeno está formado por restos de aminoácidos de las regiones variables ("V") del terminal N de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos muy divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas "regiones hipervariables", se interponen entre los tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones marco" o "FR". Por lo tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de forma natural entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesadas y ligeras se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" o "RDC". La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), Chothia *et al. Nature* 342:878-883 (1989). Las directrices para la identificación de las RDC están disponible en <http://www.bioinf.org.uk/abs/#cbrid>.

Epítipo: Como se emplea en la presente memoria, el término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico de un antígeno capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos contra péptidos N-terminales o C-terminales de un polipéptido. Un anticuerpo se dice que se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$ y más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$. Derivados biológicamente activos del epítipo de $\gamma^{377-395}$, CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ. ID. n° 18) pueden determinarse según lo dispuesto por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Ugarova *et al.* Identification of a novel recognition sequence for integrin $\alpha\text{M}\beta 2$ within the γ -chain of fibrinogen. *J Biol Chem.* 1998;273:22519-22527; Ugarova *et al.* Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 2001; 936:368-385.

Enlace inmunológico: En la presente memoria, las expresiones "enlace inmunológico" y "propiedades del enlace inmunológico" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad, de las interacciones del enlace inmunológico se pueden expresar en términos de una constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades del enlace inmunológico de polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos implica la medición de las velocidades de formación y disociación del complejo

punto de unión al antígeno/antígeno, en donde esas velocidades dependen de las concentraciones de los compañeros del complejo, la afinidad de la interacción y parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Así, tanto la "constante de velocidad de asociación" (K_a) como la "constante de velocidad de disociación" (K_d) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase *Nature* 361:186-87 (1993)). La relación de K_d / K_a permite la anulación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, en general, Davies *et al.* (1990) *Annual Rev. Biochem.* 59:439-473). Un anticuerpo de la presente invención se dice que se une específicamente al epítipo de $\gamma^{377-395}$ del fibrinógeno cuando la constante de asociación (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y aún más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$ a aproximadamente 1 pM , medido por análisis tales como análisis de unión de radioligando o análisis similares conocidos por los expertos en la técnica.

Fibrina y fibrinógeno: Como se emplea en la presente memoria, los términos "fibrina" y "fibrinógeno" se emplean indistintamente y se refieren a un polipéptido, fragmento, o análogo que conserva capacidad de unión a Mac-1. El fibrinógeno es un precursor soluble en fibrina y ambos conservan el dominio yC, y por lo tanto los epítopos de la presente invención.

Polinucleótido aislado: La expresión "polinucleótido aislado" como se emplea en la presente memoria, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna de sus combinaciones, que en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en donde el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Proteína aislada: La expresión "proteína aislada" referido en la presente memoria significa una proteína de ADNc, ARN recombinado o de origen sintético o alguna de sus combinaciones, que en virtud de su origen o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) está exenta de otras proteínas del mismo origen, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza.

Polipéptido: El término "polipéptido" se emplea en la presente memoria para referirse a proteínas naturales, fragmentos de proteínas y fragmentos o análogos de una secuencia polipeptídica. Los fragmentos y análogos de proteínas naturales se consideran especies del género polipéptido. Ejemplos de polipéptidos según la presente invención incluyen la molécula de inmunoglobulina de la cadena ligera representada como SEQ. ID. n° 1 y la molécula de inmunoglobulina de cadena pesada representada como SEQ. ID. n° 5, así como las RDC representadas como SEQ ID n° 2, n° 3, n° 4, n° 6, n° 7 y n°8, las moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de la cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de la cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de la cadena ligera kappa, y viceversa, así como uno de sus fragmentos y análogos.

De origen natural: La expresión "de origen natural" empleada en la presente memoria y aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia polinucleotídica que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio o si no es de origen natural.

Operativamente unido: La expresión "operativamente unido" tal como se emplea en la presente memoria se refiere a las posiciones de componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control "operativamente unida" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Secuencia de control: La expresión "secuencia de control", como se emplea en la presente memoria se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrión. En procariontas, dichas secuencias de control comprenden generalmente activador, punto de unión ribosómico, y secuencia de terminación de la transcripción. En eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen activadores y secuencia de terminación de la transcripción. La expresión "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y tratamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias principales y secuencias compañeras de fusión.

Polinucleótido: Como se emplea en esta memoria, el término "polinucleótido" significa un compuesto polimérico de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Oligonucleótido: Como se emplea en esta memoria, el término oligonucleótido incluye nucleótidos de origen natural, y modificados unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos de origen natural, y artificial. Los oligonucleótidos son un subconjunto polinucleotídico que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente

los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud y más preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son por lo general monocatenarios, p. ej., para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, p. ej., para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos transcritos o complementarios.

- 5 Nucleótidos de origen natural: Como se emplea en la presente memoria, la expresión "nucleótidos de origen natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados" mencionada en la presente memoria incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. La expresión "enlaces oligonucleotídicos" mencionada en la presente memoria incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato y similares. Véase p. ej., LaPlanche *et al. Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec *et al. J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984), Stein *et al. Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988), Zon *et al. Anti Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon *et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed, Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al. Patente de Estados Unidos* n° 5.151.510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para su detección sistemática, si se desea.
- 15 Se hibridan selectivamente: Como se emplea en esta memoria, la expresión "se hibridan selectivamente" significa que se unen de forma detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y uno de sus fragmentos descritos en la presente memoria se hibridan selectivamente a cadenas de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos inespecíficos. Pueden utilizarse condiciones de alta severidad para conseguir condiciones de hibridación selectivas como se conoce en la técnica y están expuestas en la presente memoria. Generalmente, la homología de secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos descritos en la presente memoria y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos 80%, y más generalmente con preferencia creciente homóloga de al menos 85%, 90%, 95%, 99% y 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, 85% de homología significa que 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para una máxima correspondencia. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que están emparejadas) en longitudes de hueco con máxima correspondencia de 5 o menos, prefiriéndose más con 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteínas (o secuencias de polipéptidos derivadas de ellas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como este término se emplea en la presente memoria, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o mayor. Véase Dayhoff, M. O, en *Atlas of Protein Sequence and Structure*, págs. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y el suplemento 2 a este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de ellas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son mayores o iguales a 50% idénticos cuando se alinean de manera óptima utilizando el programa ALIGN. La expresión "corresponde a" se emplea en la presente memoria en el sentido de que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, relacionada no estrictamente evolutiva) a toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptidos es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia. En contraposición, la expresión "complementario a" se emplea en la presente memoria en el sentido de que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

Las siguientes expresiones se emplean para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "% de identidad de secuencia" e "identidad sustancial".

- 45 Secuencia de referencia: Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de un ADNc completo o una secuencia génica de longitud dada en una lista de secuencias o puede comprender un ADNc completo o una secuencia génica. En general, una secuencia de referencia es de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente al menos de 24 nucleótidos u 8 aminoácidos de longitud, y a menudo de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Puesto que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos pueden comprender cada una (1) una secuencia (es decir, una parte de la secuencia completa de polinucleótidos o de aminoácidos) que es similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se realizan generalmente comparando secuencias de las dos moléculas sobre un "intervalo de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

- Intervalo de comparación: Un "intervalo de comparación", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos en donde una secuencia de polinucleótido o una secuencia de aminoácidos pueden compararse con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 secuencias de aminoácidos y en donde la parte de la secuencia polinucleotídica en el intervalo de comparación puede comprender adiciones, supresiones, sustituciones y similares (es decir,

huecos) de 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear un intervalo de comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 85:2444 (1988), mediante aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks o MacVector software packages), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, lo que resulta en el % más alto de homología sobre la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

Identidad de secuencia: La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos son idénticas (es decir, nucleótido a nucleótido o resto a resto) sobre el intervalo de comparación. La expresión "% de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre el intervalo de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, U o I) o resto se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en el intervalo de comparación (es decir, el tamaño del intervalo), y multiplicando el resultado por 100 para dar el % de de identidad de secuencia. Las expresiones "identidad sustancial" tal como se emplea en la presente memoria indica una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos 85% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95% de identidad de secuencia, más habitualmente al menos una identidad de secuencia del 99%, en comparación con una secuencia de referencia sobre un intervalo de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente sobre un intervalo de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en donde el % de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir supresiones o adiciones que totalizan 20% o menos de la secuencia de referencia sobre el intervalo de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor.

Aminoácidos: Como se emplea en esta memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Inmunology-A Synthesis* (2ª edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991)). Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos artificiales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales comprenden: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina, α -N-metilarginina, y otros aminoácidos y iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la anotación de polipéptidos empleada en la presente memoria, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxi-terminal, según el uso y convención ordinario. Del mismo modo, a menos que se especifique de otra manera, el extremo de la izquierda de secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5' en la dirección de la izquierda de las secuencias bicatenarias de polinucleótidos se designa dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se denomina regiones de secuencias en la dirección de transcripción de la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son el extremo 5' al 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias aguas arriba", regiones de secuencia en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el ARN y que son del extremo 3' al 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias aguas abajo".

Identidad sustancial: Aplicado a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, como por ejemplo mediante los programas GAP o BESTFIT usando cargas de huecos por defecto, comparten al menos 80% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren en las sustituciones moderadas de aminoácidos. Las sustituciones moderadas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de alifático-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución moderada de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido glutámico-ácido aspártico y asparagina-glutamina.

Como se expone en la presente memoria, las variaciones en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina se contemplan como englobados por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 90%, 95%, y más preferiblemente 99%. determinados porcentajes en el medio se incluyen, por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% y 99% de identidad de secuencia. En particular, se contemplan sustituciones moderadas de aminoácidos. Las sustituciones moderadas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen generalmente en familias: (1) aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos son la lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos apolares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) aminoácidos polares sin carga son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia hidroxialifática; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre el enlace o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido en un punto del marco. Si un cambio de aminoácido da lugar a un péptido funcional se puede determinar fácilmente analizando la actividad específica del derivado polipeptídico. Los análisis se describen en detalle en la presente memoria. Cualquier experto en la técnica puede preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los terminales amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse por comparación de los datos de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferiblemente, se usan métodos de comparación informatizados para identificar motivos de secuencia o dominios de configuración de proteína predichos que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos de identificación de secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al. Science* 253:164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y configuraciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según la invención.

Sustituciones de aminoácidos preferidas son las que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, sustituciones de uno solo o varios aminoácidos (preferiblemente sustituciones moderadas de aminoácidos) pueden realizarse en la secuencia de origen natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio(s) que forman contactos intermoleculares. Una sustitución moderada de aminoácidos no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (p. ej., un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas por la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds, Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al. Nature* 354: 105 (1991).

Fragmento de polipéptido: Como se emplea en esta memoria, el término "fragmento de polipéptido" se refiere a un polipéptido que tiene un terminal amino y/o supresión del terminal carboxi, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de ADNc completa. Los fragmentos normalmente son de al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, generalmente al menos 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a polipéptidos que se componen de un segmento de al menos 5 aminoácidos que tiene una identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene unión específica a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina, CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ. ID. n° 18), o uno de sus derivados biológicamente activo en condiciones de unión adecuadas. Por lo general, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución (o adición o eliminación) moderada de aminoácidos con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos, por lo general, son de al menos 5 aminoácidos de longitud, preferiblemente de al menos 10 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido de origen natural completo.

Los análogos peptídicos se utilizan frecuentemente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido plantilla. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986), Veber y Freidinger *TINS* pág. 392 (1985); y Evans *et al. J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Dichos compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular informatizado. Los péptidos miméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más

enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (p. ej., D-lisina en lugar de L-lisina) puede utilizarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)); por ejemplo, añadiendo restos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Agente: Como se emplea en esta memoria, el término "agente" se refiere a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos.

Marcador: Como se emplea en esta memoria, los términos "marcador" o "marcado" se refiere a la incorporación de un marcador detectable, p. ej., por incorporación de un aminoácido radiomarcado o acoplamiento a un polipéptido de restos biotínico que pueden ser detectados por avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). En determinadas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen y pueden utilizarse varios métodos de marcaje de polipéptidos y glucoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos de biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias de pares cremallera de leucina, puntos de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítipo). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

Agente farmacéutico o fármaco: Como se emplea en esta memoria, las expresiones "agente farmacéutico" o "fármaco" se refieren a un compuesto químico o composición capaz de producir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

Se utilizan otros términos químicos en la presente memoria según el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica en *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Sustancialmente puro: Como se emplea en esta memoria, la expresión "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente 85%, 90%, 95% y 99%. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición por métodos convencionales de detección sistemática) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Paciente: Como se emplea en esta memoria, el término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos monoclonales

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ del dominio γC de fibrina o fibrinógeno, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias de RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3) y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias de GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8), en donde el anticuerpo tiene una capacidad para inhibir la unión de Mac-1 a la fibrina o fibrinógeno, y en donde el anticuerpo suprime los síntomas clínicos de la encefalomielititis autoinmunitaria experimental (EAE) en el momento de la recaída. Se describen además anticuerpos que se unen al epítipo de $\gamma^{190-202}$ del dominio γC de la fibrina y el fibrinógeno. Dichos anticuerpos bloquean los efectos dañinos de la fibrina en el sistema nervioso sin afectar sus efectos beneficiosos en la coagulación de la sangre. Estos anticuerpos monoclonales pueden bloquear la formación de placas de EM y determinados cánceres. Anticuerpos ejemplares de la invención incluyen, por ejemplo, el anticuerpo 5B8 (dirigiendo el epítipo de $\gamma^{377-395}$). Además se describe el anticuerpo 1E3 (dirigiendo el epítipo de $\gamma^{190-202}$). Varias secuencias de polinucleótidos y polipéptidos relacionadas con el anticuerpo 5B8, y empleos de dichas secuencias se proporcionan en la presente memoria. Estas secuencias incluyen la secuencia de aminoácidos 5B8 de la cadena ligera (SEQ. ID. n° 1), tres secuencias de aminoácidos de la RDC de la cadena ligera (RDC-L1, SEQ. ID. n° 2; RDC-L2, SEQ. ID. n° 3 y RDC-L3, SEQ. ID. n° 4), secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ. ID. n° 5), tres secuencias de aminoácidos de la RDC de la cadena pesada

(RDC-H1, SEQ. ID. n° 6; RDC-H2, SEQ. ID. n° 7 y RDC-H3, SEQ. ID. n° 8), secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (SEQ. ID. n° 9), secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (SEQ. ID. n° 10), secuencias de nucleótidos de las tres RDC de la cadena ligera (RDC-L1, SEQ. ID. n° 11; RDC-L2, SEQ. ID. n° 12 y RDC-L3, SEQ. ID. n° 13), y secuencias de nucleótidos de las tres RDC de la cadena pesada (RDC-H1, SEQ. ID. n° 14; RDC-H2, SEQ. ID. n° 15 y RDC-H3, SEQ. ID. n° 16).

Los anticuerpos monoclonales de la invención tienen capacidad para inhibir la fagocitosis *in vitro* e *in vivo*, bloquean la liberación de citocinas y la activación de macrófagos *in vitro* e *in vivo*, la activación de microglía *in vitro* e *in vivo*, la desmielinización inflamatoria *in vitro* e *in vivo* y los síntomas clínicos en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo animal de esclerosis múltiple. Véase, p. ej., publicación PCT WO 2007/038407. Los expertos en la técnica también reconocerán que los anticuerpos monoclonales de la presente invención también pueden afectar el cáncer. Véase, e.g., publicación PCT WO 2007/024817. Además, estos anticuerpos monoclonales podrían utilizarse en el tratamiento de enfermedades que implican fugas de fibrinógeno en los tejidos dañados, incluida la artritis reumatoide, la lesión de la médula espinal, la enfermedad de Alzheimer y el accidente cerebrovascular. Véase, p. ej., Flick *et al.*, *J. Clin. Investigation*, 2007, 117, 11:3224-3235; Akassoglou *et al.*, 2002, *Neuron*, 33:861-875; Akassoglou *et al.*, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:6698-6703; Adams *et al.*, 2007, *J. Exp. Med.*, 35:2428-34. Debe tenerse en cuenta que los anticuerpos monoclonales de la presente invención reducen los efectos proinflamatorios de fibrinógeno en el cerebro y otras partes en un sujeto, mientras que al mismo tiempo conservan los efectos beneficiosos del fibrinógeno en la coagulación de la sangre, a diferencia de los compuestos que afectan a la coagulación de la sangre.

Además se describen anticuerpos que se unen a los mismos epítopos que los anticuerpos descritos en la presente memoria. Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal de la invención determinando si el primero impide que el último se una al epítipo de $\gamma^{377-395}$ o al epítipo de $\gamma^{190-202}$ del dominio γ C de la fibrina. Si el anticuerpo monoclonal que se está probando compete con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se de muestra por una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal de la invención, entonces es probable que los dos anticuerpos monoclonales se unan al mismo, o a un epítipo estrechamente relacionado. La detección sistemática de anticuerpos monoclonales de la invención puede llevarse a cabo midiendo la capacidad de bloquear la adhesión de la microglía mediante el receptor Mac-1 en el polipéptido completo de fibrinógeno. En la presente memoria se proporcionan ejemplos de dicha detección sistemática.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizarse para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra el enlace fibrinógeno-Mac-1, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de los mismos. (Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, anteriormente).

Los anticuerpos se purifican por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad utilizando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del antisuero. Posterior, o alternativamente, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o uno de sus epítopos, se puede inmovilizar en una columna para purificar el antianticuerpo específico por cromatografía de inmunoafinidad.

Los anticuerpos de la invención (p. ej., 5B8) son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales que inhiben la unión fibrinógeno/Mac-1 son generados, p. ej., por los clones obtenidos de animales que han sido inmunizados con un antígeno peptídico. Las estirpes celulares se producen fusionando linfocitos B del animal inmunizado con células de mieloma. Los anticuerpos se purifican, ya sea *in vitro* en los medios de producción de ascitis en ratones. Los métodos de producción de anticuerpos también se proporcionan en la sección de Ejemplos a continuación.

Los anticuerpos monoclonales se preparan, por ejemplo, utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal anfitrión apropiado, por lo general se inmuniza con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá por lo general el antígeno proteico, uno de sus fragmentos o una de sus proteínas de fusión. En general, se utilizan linfocitos de la sangre periférica si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean células de origen de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan a continuación con una estirpe celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Las estirpes celulares inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, especialmente células de mieloma de roedor, bovino y de origen humano. Por lo general, se emplean estirpes celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, si las células originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá por lo general

hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células carentes de hprt.

Las estirpes celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan la expresión de alto nivel estable de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las estirpes celulares inmortalizadas más preferidas son las estirpes de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif., y la American Type Culture Collection, Manassas, Va. Se han descrito también estirpes celulares de mieloma humano y de células de heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales. (Véase Kozbor, *J. Immuno.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63)).

En el medio de cultivo en donde se cultivan a continuación las células de hibridoma, puede analizarse la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un análisis de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980); Patrono, C. y Peskar, B. A. (eds.) *Radioimmunoassay: An Overview. J. Clin. Biochem.*, Heidelberg, Springer-Verlag, 1987; Dwenger, A. *Radioimmunoassay: An Overview. J. Clin. Biochem.* 22:883, 1984. *Por otra parte, en aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad y una gran afinidad de unión por el antígeno diana.

Una vez identificadas las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitativos y cultivarse por procedimientos convencionales. (Véase Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio Eagle modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del líquido ascítico por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales por procedimientos de ADN recombinado, tales como los descritos en la patente de EE.UU. n° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Por ejemplo, las SEQ. ID. n° 9 y n° 10 proporcionan las secuencias de nucleótidos para el anticuerpo monoclonal 5B8 de la presente invención. Las células de hibridoma descritas en la presente memoria sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células anfitrión tales como las células de simio COS, las células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrión recombinadas. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase la Patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) o uniéndose por enlace covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Dicho polipéptido distinto de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un punto de combinación con el antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo híbrido bivalente.

Anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en donde toda la secuencia tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluidas las RDC, surgen a partir de genes humanos. Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos", o "anticuerpos completamente humanos" en la presente memoria. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar empleando la técnica de trioma; la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (véase Kozbor, *et al.*, 1983 *Immunol. Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma del VEB para producir anticuerpos monoclonales (véase Cole, *et al.*, 1985 en: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Pueden utilizar y producirse anticuerpos monoclonales usando hibridomas humanos (véase Cote, *et al.*, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030) o transformando linfocitos B humanos con el virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, *et al.*, 1985 en: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

Además, los anticuerpos humanos también pueden producirse empleando técnicas adicionales, incluidas bibliotecas de presentación de fagos. (Véase Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). De manera similar, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina

endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras la prueba de provocación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja bastante a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluidos el reordenamiento génico, el montaje, y el repertorio de anticuerpos. Este método se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.545.807; n° 5.545.806; n° 5.569.825; n° 5.625.126; n° 5.633.425; n° 5.661.016, y en Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992.); Lonberg y otros, *Nature* 368 856-859 (1994.); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

Los anticuerpos humanos pueden producirse, además, utilizando los animales no humanos transgénicos que se modifican para producir anticuerpos totalmente humanos en lugar de anticuerpos endógenos de animales en respuesta a la provocación por un antígeno. En dichos animales, los genes endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en el anfitrión no humano han sido incapacitados, y los locus activos que codifican inmunoglobulinas de la cadena pesada y ligera humanas se insertan en el genoma del anfitrión. Por ejemplo, las SEQ. ID. n° 11 a n° 16 proporcionan las secuencias de nucleótidos que codifican las tres cadenas ligeras y tres RDC de la cadena pesada de anticuerpo monoclonal 5B8. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, empleando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humanos necesarios. Se obtiene entonces un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como prole por cruzamiento de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. Un ejemplo de dicho animal no humano es un ratón denominado el Xenomouse[®] producido por Amgen (Thousand Oaks, CA). Este animal produce linfocitos B que segregan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos pueden obtenerse directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, un preparado de un anticuerpo policlonal, o alternativamente a partir de linfocitos B inmortalizados extraídos del animal, tales como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Además, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse más para obtener análogos de anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas monocatenarias Fv (scFv).

Un ejemplo de un método de producción de un anfitrión no humano, ejemplificado como un ratón, que carece de expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena se describe en la Patente de EE.UU. n° 5.939.598. Puede obtenerse por un método, que incluye la eliminación de los genes del segmento J de al menos un locus de la cadena pesada endógena en una célula madre embrionaria para evitar la reordenación del locus y para evitar la formación de un transcrito de un locus reordenado de la cadena pesada de inmunoglobulina, efectuándose la eliminación por un vector dirigido que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y produciendo a partir de la célula madre embrionaria un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica el marcador seleccionable.

Un método para la producción de un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se da a conocer en la patente de EE.UU. n° 5.916.771. Este método incluye la introducción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada (p. ej., SEQ. ID. n° 10) en una célula anfitrión de mamífero en cultivo, la introducción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera (p. ej., SEQ. ID. n° 9) en otra célula anfitrión de mamífero, y la fusión de las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

El anticuerpo puede ser expresado por un vector que contiene un segmento de ADN que codifica el anticuerpo monocatenario descrito anteriormente.

Estos pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por adyuvante, acelerador de genes, y catéteres. Los vectores preferidos incluyen vectores víricos, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovíricos incluyen virus de la leucemia murina de Moloney. Se prefieren los vectores víricos de ADN. Estos vectores incluyen pox vectores, tales como vectores ortopox o de la viruela aviar, vectores de herpesvirus, tales como un vector del virus del herpes simple de tipo I (VHS) (véase Geller, A. I. *et al.*, *J. Neurochem.*, 64:487 (1995); Lim, F., *et al.*, en *DNA Cloning: Mammalian Systems.*, D. Glover, Ed (Oxford Univ. Press, Oxford Inglaterra) (1995); Geller, A. I. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 90:7603 (1993); Geller, A. I., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1149 (1990), vectores de adenovirus (véase LeGal LaSalle *et al.*, *Science*, 259:988 (1993); Davidson, *et al.*, *Nat. Genet.* 3:219 (1993); Yang, *et al.*, *J. Virol.* 69:2004 (1995) y vectores de virus adeno-asociados (véase Kaplitt, M.G. *et al.*, *Nat. Genet.* 8:148 (1994).

Los vectores pox víricos introducen el gen en el citoplasma celular. Vectores de virus de la viruela aviar como dan lugar solamente a una expresión del ácido nucleico a corto plazo. Los vectores de adenovirus, los vectores de virus adeno-asociados y los vectores del virus del herpes simple (VHS) se prefieren para introducir el ácido nucleico en células neuronales. El vector de adenovirus da lugar a una expresión a más corto plazo (alrededor de 2 meses) que el virus adeno-asociado (alrededor de 4 meses), que a su vez es más corto que los vectores de VHS. El vector específico seleccionado dependerá de la célula diana y la enfermedad a tratar. La introducción puede ser por técnicas estándar, p. ej., infección, transfección, transducción o transformación. Ejemplos de modos de transferencia

génica incluyen p. ej., ADN desnudo, precipitación con CaPO_4 , DEAE dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección de células y vectores víricos.

El vector puede emplearse para dirigir esencialmente cualquier célula diana deseada. Por ejemplo, puede utilizarse inyección estereotáxica para dirigir los vectores (p. ej., adenovirus, VHS) a una posición deseada. Además, las partículas pueden administrarse por infusión intracerebroventricular (icv) usando un sistema de infusión con minibomba, como un SynchroMed Infusion System (Medtronic, Minneapolis, MN). Otros métodos que pueden emplearse incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y las vías de administración oral u otras conocidas.

Estos vectores pueden usarse para expresar grandes cantidades de anticuerpos que pueden utilizarse de varias maneras. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de fibrinógeno y el enlace fibrinógeno/Mac-1.

Pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para una proteína antigénica descrita en la presente memoria (véase, p. ej., patente de EE.UU. N° 4.946.778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de F_{ab} (véase, por ejemplo, Huse, *et al.*, 1989 *Science* 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos F_{ab} monoclonales con la especificidad deseada para una proteína o uno de sus derivados, fragmentos, análogos u homólogos. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos contra un antígeno proteico se pueden producir por técnicas conocidas en la técnica, incluidas, pero no limitadas a: (i) un fragmento $F_{(ab)2}$ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento F_{ab} generado por reducción de los puentes disulfuro de un fragmento $F_{(ab)2}$; (iii) un fragmento F_{ab} generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos F_v . La invención también incluye fragmentos F_v , F_{ab} , F_{ab}' y $\gamma^{377-395}$ anti-fibrina $F_{(ab)2}$, anticuerpos $\gamma^{377-395}$ anti-fibrina monocatenarios, anticuerpos $\gamma^{377-395}$ anti-fibrina biespecíficos y anticuerpos $\gamma^{377-395}$ anti-fibrina heteroconjugados.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína de la superficie celular o un receptor o subunidad de receptor.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción biotecnológica de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra generalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad.

Dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el punto necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo anfitrión adecuado. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., $F_{(ab)2}$ de anticuerpos biespecíficos). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos empleando enlaces químicos. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en donde anticuerpos íntegros se cortan mediante proteólisis para generar fragmentos $F_{(ab)2}$. Estos fragmentos se reducen en presencia del arseniuro de sodio agente complejante de ditiol para estabilizar los ditiolos adyacentes y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos F_{ab} generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados $F_{ab}'\text{-TNB}$ se reconvierte a continuación en $F_{ab}'\text{-tiol}$ mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado $F_{ab}'\text{-TNB}$ para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Además, los fragmentos F_{ab}' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula $F_{(ab)2}$ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado.

Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos de células recombinadas. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos

utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos puntos de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado contra un agente citotóxico, tal como una toxina (p. ej., un agente quimioterapéutico dirigido selectivamente contra células cancerosas, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos), o una isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos comprenden agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antraciclina y fármacos relacionados, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de la mitosis, hormonas corticosteroides y otros medicamentos de quimioterapia.

Las toxinas enzimáticamente activas y uno de sus fragmentos que pueden utilizarse comprenden la cadena A antidiftérica, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A del ricino, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de la diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, enzimas de restricción, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Para la producción de anticuerpos radioconjugados están disponibles una variedad de radionúclidos. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados de anticuerpos y de agentes citotóxicos se preparan utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como sepiato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzilo) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzilo)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricino como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos para el anticuerpo.

Los expertos en la técnica reconocerán que una gran variedad de posibles restos se puede acoplar a los anticuerpos resultantes de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (eds.), Carger Press, Nueva York, (1989)).

El acoplamiento puede realizarse por cualquier reacción química que una las dos moléculas, siempre que el anticuerpo y el otro resto conserven sus respectivas actividades. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo, enlace covalente, unión por afinidad, intercalado, unión y complejación coordinada. El enlace preferido es, sin embargo, el enlace covalente. El enlace covalente puede conseguirse ya sea por condensación directa de las cadenas laterales existentes o por la incorporación de moléculas puente externas. Muchos agentes enlazadores bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas de proteína, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidias, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametildiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino más bien, es ilustrativa de los agentes de acoplamiento más corrientes. (Véase Killen y Lindstrom, *Jour. Immun.* 133: 1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); y Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987).

Los enlazadores se describen en la bibliografía. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. *et al.*, *Cancer Res.* 44:201-208 (1984) que describen el uso de MBS (éster de M-maleimidobenziloil-N-hidroxisuccinimida) Véase también, patente de EE.UU. N° 5.030.719, que describe el uso de un derivado de acetil hidrazida halogenado acoplado a un anticuerpo por medio de un enlazador de oligopéptido. Los ejemplos de enlazadores incluyen: (i) EDC hidrocioruro (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida; (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP hexanoato de (succinimidil-6[3-(2-piridilditio) propionamido] (Pierce Chem Co., Cat. n° 21651G); (iv) sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6[3-(2-piridilditio)-propionamido] hexanoato (Pierce Chem. Co. Cat n° 2165-G); y (v) sulfo-NHS(N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem Co., Cat. n° 24510) conjugado con EDC.

Los enlazadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen atributos diferentes, lo que conduce a conjugados con diferentes propiedades físico-químicas. Por ejemplo, los sulfo-NHS ésteres de carboxilatos de alquilo son más estables que los sulfo-NHS ésteres de carboxilatos aromáticos. Los enlazadores que contienen NHS-éster son menos solubles que los sulfo-NHS ésteres. Además, el enlazador SMPT contiene un enlace disulfuro estéricamente impedido y puede formar conjugados con mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro son, en general, menos estables que otros enlaces porque el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado menos conjugado disponible. Sulfo-NHS, en concreto, puede mejorar la estabilidad de los acoplamientos carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tales como EDC) cuando se utiliza junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); y patentes de EE.UU. n° 4.485.045 y n° 4.544.545. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la patente de EE.UU. n° 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina modificada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos F_{ab} del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuros.

Empleo de anticuerpos contra los epítopos de fibrina $\gamma^{190-202}$ y $\gamma^{377-395}$

Las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo monoclonal de la invención, se utilizan para tratar o aliviar un síntoma asociado a un trastorno relacionado con la fibrina (p. ej., la esclerosis múltiple, la cicatrización de heridas, la isquemia pulmonar, la lesión de la médula espinal, la enfermedad de Alzheimer, el accidente cerebrovascular, la artritis reumatoide y el cáncer), preferiblemente sin afectar a la coagulación de la sangre. La presente invención también proporciona los anticuerpos de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la fibrina (p. ej., la esclerosis múltiple, la cicatrización de heridas, la isquemia pulmonar, la lesión de la médula espinal, la enfermedad de Alzheimer, el accidente cerebrovascular, la artritis reumatoide y el cáncer), preferiblemente sin afectar a la coagulación de la sangre. Un régimen terapéutico se lleva a cabo al identificar un sujeto, p. ej., un paciente humano que padece (o está en situación de riesgo de desarrollar) un trastorno relacionado con la fibrina (p. ej., la esclerosis múltiple, la cicatrización de heridas, la isquemia pulmonar, lesión de la médula espinal, la enfermedad de Alzheimer, el accidente cerebrovascular, la artritis reumatoide y el cáncer), utilizando métodos estándar. Los síntomas asociados a estos trastornos relacionados con la fibrina incluyen, por ejemplo, la inflamación, el dolor y la pérdida de percepción sensorial. La eficacia del tratamiento se determina junto con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el trastorno concreto relacionado con la fibrina. El alivio de uno o más síntomas de trastorno relacionado con la fibrina indica que el anticuerpo confiere una cualidad clínica. Un preparado de anticuerpos, preferiblemente uno que tenga gran especificidad y gran afinidad por su antígeno diana, se administra al sujeto y, en general tendrá un efecto debido a su unión con la diana. La administración del anticuerpo puede abolir, inhibir o interferir con la función de señalización de la diana (los epítopos $\gamma^{190-202}$ y $\gamma^{377-395}$ de fibrina). La administración del anticuerpo puede abolir, inhibir o interferir con la unión de la diana (p. ej., fibrina) con un ligando endógeno (p. ej., Mac-1) a la que se une de forma natural. Por ejemplo, el anticuerpo se une a la diana e inhibe el enlace fibrina/Mac-1.

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la invención se administre con vehículos, excipientes, y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, suministro, tolerancia y similares. Una gran cantidad de formulaciones apropiadas se puede encontrar en el formulario *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19ª ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)), concretamente el capítulo 87 de Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones comprenden, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (aniónicos o catiónicos) (tales como Lipofectina™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente invención, siempre que el principio activo en la formulación no esté inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance" *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Liophilization and development of solid protein pharmaceuticals" *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60 (2000), Charman W. N. Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." *J. Pharm. Sci.* 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52:238-311 (1998) y las citas en éste para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Los anticuerpos de la invención (también denominados en la presente memoria "compuestos activos"), y uno de sus derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas que pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se emplea en esta memoria, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción retardantes, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, texto de referencia habitual en el campo. Los ejemplos preferidos de dichos vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humana al 5%. Pueden usarse también liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, su uso se contempla en las composiciones. Los compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen la parenteral, p. ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (es decir, tópica), a través de las mucosas, y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. El preparado parenteral puede estar contenido en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para el preparado improvisado de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición puede ser estéril y debe ser fluida de manera que sea fácil de inyectar. Puede ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden estar contenidos en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, grageas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para su uso como colutorio, en donde el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita y se expectora o se traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o los materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregador tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un fluidificante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un pulverizador de aerosol desde el recipiente o dispensador presurizado que contiene un gas propulsor adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

5 La administración general también puede ser a través de la mucosa o por vía transdérmica. Para la administración a través de la mucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración a través de la mucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración a través de la mucosa puede conseguirse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce
10 generalmente en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

15 En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protejan el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos)
20 también pueden utilizarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosis individuales para facilidad de administración y uniformidad de dosis. Forma de dosis individual tal como se emplea en esta memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada
25 unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis individuales de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico concreto a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden estar contenidas en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas de péptidos que conservan la capacidad de unirse a la
35 secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinado. (Véase, p. ej., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889 hasta 7893 (1993)). La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por
40 ejemplo, un agente citotóxico, citocinas, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de
45 coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Las formulaciones que deben utilizarse para administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

50 Pueden prepararse preparados de liberación lenta. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación lenta comprenden matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación lenta incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no
55 degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-D-(-)-ácido 3-hidroxi-butírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y

ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante períodos más cortos.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención se refiere en general a la cantidad necesaria para lograr un objetivo terapéutico. Como se indicó anteriormente, esta puede ser una interacción de enlace entre el anticuerpo y su antígeno diana que, en determinados casos, interfiere con el funcionamiento de la diana. La cantidad requerida a administrar, además, dependerá de la afinidad de unión del anticuerpo por su antígeno específico, y también dependerá de la velocidad a la que se elimina un anticuerpo administrado del volumen libre de otro sujeto al que se administra. Intervalos comunes para la dosificación terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitativo, desde aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez a la semana.

Métodos de detección sistemática de anticuerpos

Los métodos para la detección sistemática de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunosorbente con enzima ligada (ELISA) y otras técnicas inmunológicamente mediadas conocidas en la técnica.

Los anticuerpos dirigidos contra los epítomos $\gamma^{190-202}$ y $\gamma^{377-395}$ de fibrina pueden utilizarse en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de la fibrina. En una realización dada, los anticuerpos específicos a los epítomos $\gamma^{377-395}$ de fibrina, o uno de sus derivados, fragmentos, análogos u homólogos, que contienen el dominio de unión del antígeno derivado del anticuerpo, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo "compuestos terapéuticos").

Un anticuerpo específico para los epítomos $\gamma^{190-202}$ y $\gamma^{377-395}$ de fibrina puede utilizarse para aislar el polipéptido de fibrina mediante técnicas estándar, tales como inmunofluorescencia, cromatografía o inmunoprecipitación. La detección sistemática puede facilitarse por acoplamiento (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables comprenden diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas comprenden peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados comprenden estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados comprenden umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes comprenden luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados comprenden ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Un anticuerpo según la invención puede utilizarse como un agente para detectar la presencia de epítomo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina en una muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene un marcador detectable. Los anticuerpos son policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se utiliza un anticuerpo intacto, o uno de sus fragmentos (p. ej., F_{ab} , scFv o $F_{(ab)2}$). El término "marcado", con respecto a la sonda o al anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o del anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección sistemática de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y marcaje del extremo de una sonda de ADN con biotina de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada con fluorescencia. En la expresión "muestra biológica" se pretende incluir tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y líquidos presentes dentro de un sujeto. Incluido dentro del empleo de la expresión "muestra biológica", por lo tanto, está la sangre y una fracción o componente de la sangre, incluidos suero sanguíneo, plasma sanguíneo o la linfa. Es decir, el método de detección sistemática descrito en la presente memoria se puede utilizar para detectar un ARNm, proteína o ADN genómico del analito en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección sistemática de un ARNm del analito incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección sistemática de un proteína del analito incluyen ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección sistemática de un ADN genómico del analito incluyen hibridaciones Southern. Los procedimientos para la realización de inmunoanálisis se describen, por ejemplo, en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, N. J., 1995; "Immunoassay", E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Además, las técnicas *in vivo* para la detección sistemática de una proteína del analito incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo proteico anti-analito marcado. El anticuerpo puede marcarse, por ejemplo, con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de diagnóstico por la imagen típicas.

Métodos de detección sistemática de inhibidores

Se describen en la presente memoria métodos (también denominados en la presente memoria "ensayos de detección sistemática") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes experimentales o de ensayo (p. ej., péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que modulan o si no interfieren con el enlace de la fibrina y Mac-1, o compuestos o agentes experimentales o de ensayo que modulan o si no interfieren con la función de señalización de la fibrina, Mac-1 y/o el complejo fibrina/Mac-1. Se describen además compuestos identificados en los ensayos de detección sistemática descritos en la presente memoria.

Se describen además los ensayos para la identificación sistemática de compuestos experimentales o de ensayo que modulan la función de señalización del complejo fibrina/Mac-1 y/o la interacción entre la fibrina y Mac-1. Los compuestos de ensayo descritos en la presente memoria pueden obtenerse empleando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluidos: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase de solución o en fase sólida paralelas espacialmente dirigibles; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de biblioteca "una perla un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas que utilizan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica está limitado a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos peptídicos, oligómeros no peptídicos o de pequeñas moléculas. (Véase, p. ej., Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

Una "molécula pequeña", como se emplea en esta memoria, se entiende que se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y aún más preferiblemente menos de aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, p. ej., ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos de hongos, bacterias o algas, se conocen en la técnica y se pueden detectar con cualquiera de los análisis descritos en la presente memoria.

En la técnica pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt, *et al.*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb, *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann, *et al.*, 1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho, *et al.*, 1993. *Science* 261: 1303; Carrell, *et al.*, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell, *et al.*, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop, *et al.*, 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (véase p. ej., Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (véase Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), en chips (véase Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), bacterias (véase la patente de EE.UU. nº 5.223.409), esporas (véase la patente de EE.UU. nº 5.233.409), plásmidos (véase Cull, *et al.*, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o en fagos (véase Scott y Smith, 1990. *Science* 249:386-390; Devlin, 1990. *Science* 249: 404- 406; Cwirla, *et al.*, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol Biol.* 222: 301-310; y patente de EE.UU. nº 5.233.409).

En la presente memoria se describe que un compuesto experimental se introduce en un complejo anticuerpo-antígeno y que determina si el compuesto experimental altera el complejo anticuerpo-antígeno, en donde una ruptura de este complejo indica que el compuesto experimental modula la función de señalización del complejo fibrina/Mac-1 y/o la interacción entre la fibrina y Mac-1. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 5B8 y el complejo antígeno-fibrinógeno. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal es 1E3 y el antígeno es el fibrinógeno.

Además se describe que se proporciona un complejo fibrina/Mac-1 y se expone al menos un anticuerpo monoclonal neutralizante. Se detecta la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, y se introducen en el complejo uno o más compuestos experimentales. Si el complejo anticuerpo-antígeno se rompe después de la introducción de los uno o más compuestos experimentales, los compuestos experimentales son útiles para tratar trastornos asociados con el enlace fibrina/Mac-1.

Además se describe que una proteína quimérica soluble descrita en la presente memoria se proporciona y se expone al menos a un anticuerpo monoclonal neutralizante. Se detecta la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, y uno o más compuestos experimentales se introducen en el complejo. Si el complejo anticuerpo-antígeno se rompe después de la introducción de uno o más compuestos experimentales, los compuestos experimentales son útiles para tratar trastornos relacionados con el enlace fibrina/Mac-1.

La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interferir con o romper el complejo anticuerpo-antígeno se puede llevar a cabo, por ejemplo, acoplado del compuesto de ensayo con un radioisótopo o marcador enzimático de tal forma que la unión del compuesto de ensayo con el antígeno o una de sus partes biológicamente activa puede determinarse detectando el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos de ensayo pueden marcarse con ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³H, ya sea directa o indirectamente, y el radioisótopo puede detectarse por recuento directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Alternativamente, los compuestos de ensayo pueden marcarse enzimáticamente, por ejemplo con, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y el marcador enzimático detectarse por determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

En la presente memoria se da a conocer que el ensayo comprende poner en contacto un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con

el antígeno o si no alterar el complejo anticuerpo-antígeno existente. En esta descripción, la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con el antígeno y/o alterar el complejo anticuerpo-antígeno comprende determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente al antígeno o a una de sus partes biológicamente activas, en comparación con el anticuerpo.

5 Se describe además que el ensayo comprende poner en contacto un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular el complejo anticuerpo-antígeno. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular el complejo antígeno-anticuerpo se puede realizar, por ejemplo, determinando la capacidad del antígeno para unirse o interactuar con el anticuerpo en presencia del compuesto de ensayo.

10 Los expertos en la técnica reconocerán que, en cualquiera de los métodos de detección sistemática descritos en la presente memoria, el anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante, tal como un anticuerpo monoclonal 5B8 y/o 1E3, cada uno de los cuales modula o si no interfiere con el enlace fibrina/Mac-1.

Puede ser deseable inmovilizar el anticuerpo o el antígeno para facilitar la separación de formas complejadas de las no complejadas de una o ambas después de la introducción del compuesto experimental, así como acomodar la automatización del ensayo. La observación del complejo antígeno-anticuerpo, en presencia y ausencia de un compuesto experimental, puede realizarse en cualquier recipiente adecuado que contenga los reactivos. Ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microvaloración, tubos de ensayo y tubos de microcentrifugadora. Puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite a una o ambas de las proteínas que se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión GST-anticuerpo o las proteínas de fusión GST-antígeno pueden adsorber en perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microvaloración modificadas con glutatión, que luego se combinan con el compuesto de ensayo, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejos (p. ej., en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas o los pocillos de la placa de microvaloración se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz se inmoviliza en el caso de perlas, el complejo se determina directa o indirectamente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, y el nivel de la formación de complejos anticuerpo-antígeno se pueden determinar usando técnicas estándar.

También se pueden utilizar otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices en los ensayos de selección descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el anticuerpo (p. ej. 5B8 y/o 1E3) o el antígeno (p. ej. fibrina) pueden inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Moléculas biotiniladas de anticuerpo o antígeno se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas bien conocidas en la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o el antígeno de interés, pero que no interfieren con la formación del complejo anticuerpo-antígeno de interés, pueden modificarse en los pocillos de la placa, y el anticuerpo o antígeno no unido atrapados en los pocillos por conjugación de anticuerpos. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos usando dichos otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o antígeno.

Además en la presente memoria se describen nuevos agentes identificados por cualquiera de los ensayos de detección sistemática mencionados anteriormente y sus usos para los tratamientos como los descritos en la presente memoria.

Ensayos de diagnóstico

Los anticuerpos de la presente invención pueden detectarse mediante análisis apropiados, p. ej., tipos convencionales de inmunoanálisis, p. ej., puede realizarse un ensayo sándwich en donde el fibrinógeno completo, fibrina o uno de sus fragmentos está fijado a una fase sólida. La incubación se mantiene durante un período de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo en la muestra se una al polipéptido inmovilizado sobre la fase sólida. Después de esta primera incubación, la fase sólida se separa de la muestra. La fase sólida se lava para eliminar los materiales no unidos y sustancias que interfieren, tales como proteínas no específicas que también pueden estar presentes en la muestra. La fase sólida que contiene el anticuerpo de interés (p. ej., anticuerpo monoclonal 5B8 y/o 1E3) unido al polipéptido inmovilizado se incuba posteriormente con un segundo, anticuerpo marcado o anticuerpo unido a un agente de acoplamiento tal como biotina o avidina. Este segundo anticuerpo puede ser otro anticuerpo anti-fibrina. Los marcadores de anticuerpos son bien conocidos en la técnica e incluyen radionúclidos, enzimas (p. ej. maleato deshidrogenasa, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, catalasa), compuestos fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficocianina, fluorescarmina), biotina y similares. Se incuban con el sólido los anticuerpos marcados y se mide el marcador unido a la fase sólida. Cualquier experto en la técnica puede realizar fácilmente estos y otros inmunoanálisis.

Un método ejemplar para detectar la presencia o ausencia de una proteína de fibrina en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de la prueba y poner en contacto la muestra biológica con un

anticuerpo monoclonal marcado según la invención de modo que se detecta la presencia de fibrina en la muestra biológica.

Como se emplea en esta memoria, el término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, enlazando físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección sistemática de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y marcado en el extremo de una sonda de ADN con biotina de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada con fluorescencia. La expresión "muestra biológica" se pretende que incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Es decir, el método de detección sistemática descrito en la presente memoria se pueden usar para detectar fibrina en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección sistemática de fibrina incluyen ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Además, las técnicas *in vivo* para la detección sistemática de fibrina incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-fibrina marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de diagnóstico por la imagen típicas.

En la presente memoria se describe que la muestra biológica contiene moléculas de proteína del sujeto de ensayo. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de la sangre periférica aislada por medios convencionales de un sujeto.

Equipos

La invención también comprende equipos para detectar la presencia de fibrina en una muestra biológica. El equipo comprende un anticuerpo de la invención e instrucciones para usar el equipo para detectar fibrina en una muestra. Por ejemplo, el equipo puede comprender: un compuesto o agente marcado capaz de detectar fibrina en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de fibrina en la muestra; y medios para comparar la cantidad de fibrina en la muestra con un patrón. El compuesto o agente puede envasarse en un recipiente adecuado.

La invención se describe además en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Aspectos de lo dado a conocer en esta memoria se pueden entender mejor a la luz de los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse restrictivos del alcance de lo dado a conocer en esta memoria en modo alguno.

Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos monoclonales

Se sintetizaron secuencias peptídicas correspondientes a los aminoácidos exactos en la cadena γ de fibrinógeno que se han demostrado ser cruciales para la interacción de fibrinógeno con Mac-1 (péptido n° 1: CGWTVLQKRIDGSL (SEQ. ID. n° 17) y péptido n° 2: CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ. ID. n° 18)). Estos dos péptidos se sintetizaron con los correspondientes restos de cisteína del terminal N para permitir la conjugación a la proteína portadora hemocianina de lapa californiana (KLH), que estimula una fuerte respuesta de anticuerpos *in vivo*. Ambos péptidos se utilizaron para inmunizar a tres ratones que generan una respuesta de anticuerpos en estos ratones. La detección sistemática preliminar de suero puso de manifiesto un fuerte valor de anticuerpos contra estos péptidos y condujo a la generación posterior de hibridomas que producen anticuerpos clonales contra estas dos secuencias peptídicas. La detección sistemática inicial de 480 clones de hibridoma se realizó por ELISA contra ambos péptidos, así como la proteína portadora. Los clones positivos se expandieron y se volvieron a ensayar para confirmar la reactividad del epítipo del péptido por ELISA. Los resultados finales de esta detección sistemática inicial dio lugar a 46 clones que eran específicos para el péptido n° 1 o el n° 2. En un análisis en profundidad de estos resultados del ELISA se identificaron 16 dianas experimentales para un examen más detenido. En estos 16 clones se identificó su capacidad para bloquear la adhesión microglial mediante el receptor Mac-1 sobre el fibrinógeno completo. Se recubrieron pocillos de cultivo hístico con 50 $\mu\text{g/ml}$ de fibrinógeno tras lo cual los microgliocitos (200.000 células/ml) se colocaron en placas en presencia de estos clones de anticuerpos. Los pocillos se lavaron después de 30 minutos y las células adherentes restantes se tiñeron con cristal violeta al 0,1%. Las células teñidas se fijaron con PFA al 1% y se disolvieron con Triton X-100 al 0,5%. Cinco de estos clones presentaban una capacidad significativa, similar a la de un anticuerpo bloqueante contra Mac-1 (M1/70) disponible en el mercado, para evitar la adhesión microglial al fibrinógeno tal como se evaluó mediante mediciones de absorbancia a 595 nm (Figura 1; que tiene una inhibición superior al 20% medida por el cambio en la absorbancia). Se contempla que los anticuerpos de la invención puedan evitar la adhesión microglial al fibrinógeno a valores mayores de 30%, 40% o 50%. Los clones 1A5, 1D6 y 1E3 reconocen el epítipo del péptido n° 1 mientras que los clones 4E11 y 5B8 reconocen el epítipo del péptido n° 2. Estos cinco clones se continuó analizando su capacidad para reconocer fibrinógeno por inmunotransferencia. Los cinco anticuerpos reconocieron la cadena γ de fibrinógeno en un grado similar. Para examinar si estos anticuerpos reconocían el fibrinógeno en función de la dosis se realizó un ELISA sobre fibrinógeno completo recubierto (Figura 2). Se descubrió que los cinco anticuerpos se unen específicamente aumentando las concentraciones de fibrinógeno

completo. De estos cinco anticuerpos se seleccionaron tres (1E3, 4E11 y 5B8, que tienen una inhibición mayor del 50% de Mac-1 de unión al dominio γ C de fibrina o fibrinógeno cuando se mide mediante el cambio en la absorbancia) para aislamiento y purificación a gran escala. Se contempla que los anticuerpos de la invención pueden inhibir la unión de Mac-1 a la fibrina en más del 50%, 60% o 70%. Inicialmente, 20 mg de los tres anticuerpos se purificaron para su empleo en ensayos de fagocitosis *in vitro* y en experimentos de EAE.

Ejemplo 2 - Los anticuerpos monoclonales contra la cadena γ de fibrinógeno inhiben la fagocitosis por microglia

La fagocitosis es una función importante de la microglía y los macrófagos activados con la mediación de Mac-1. Se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis en microglía según se describió anteriormente. Véase, Adams *et al.*, 2007, *J. Exp. Med.* 204:571-582, incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad. El péptido $\gamma^{377-395}$ derivado de fibrina inhibe la activación de la microglía y suprime la parálisis recurrente en la enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso central. El anticuerpo monoclonal 5B8 el contra el epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina modificado presentaba una eficacia superior en la inhibición de la fagocitosis *in vitro*. Este anticuerpo en estudios *in vivo* presenta una administración profiláctica y terapéutica en modelos animales para EM como se ha descrito anteriormente para el péptido $\gamma^{377-395}$.

Ejemplo 3 – El anticuerpo monoclonal 5B8 suprime la incidencia de recaídas en un modelo animal de recaídas remitente de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental

Para evaluar los efectos de los anticuerpos de fibrina en la regulación de la activación de la microglía y la desmielinización *in vivo*, se administraron a ratones dos de los clones identificados en el ensayo de fagocitosis después del desarrollo de PLP EAE. Se administraron anticuerpos 5B8 y 4E11 tres veces a la semana a razón de 250 μ g por ratón. Como se muestra en la figura 4, el anticuerpo 4E11 no tuvo un efecto sustancial en el desarrollo de EAE. Por el contrario, el anticuerpo 5B8 presentó una supresión de los síntomas clínicos en el momento de la recaída.

La presente descripción también se refiere a los siguientes puntos:

- Punto 1. Un anticuerpo aislado que se une a un dominio yC de fibrina o fibrinógeno, en donde el anticuerpo presenta más del 20% de inhibición de la adhesión microglial al dominio yC de fibrina o fibrinógeno.
- 5 Punto 2. Un anticuerpo aislado que se une al dominio yC de fibrina o fibrinógeno, en donde el anticuerpo presenta más del 50% de inhibición de la unión de Mac-1 al dominio yC de fibrina o fibrinógeno.
- Punto 3. Un anticuerpo aislado que se une al dominio yC de fibrina o fibrinógeno, en donde el anticuerpo suprime los síntomas clínicos de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en el momento de la recaída.
- Punto 4. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 3, donde el anticuerpo se une a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ del dominio yC de fibrina o fibrinógeno.
- 10 Punto 5. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 3, donde el anticuerpo se une a un epítipo de $\gamma^{190-202}$ del dominio yC de fibrina o fibrinógeno.
- Punto 6. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- Punto 7. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- Punto 8. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 15 Punto 9. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3) y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4).
- 20 Punto 10. El anticuerpo de los puntos 1 a 8, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8).
- Punto 11. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8).
- 25 Punto 12. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 11, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera de SEQ. ID. n° 1.
- Punto 13. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 11, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada de la SEQ. ID. n° 5.
- 30 Punto 14. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 11, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera de la SEQ. ID. n° 1 y una secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada de la SEQ. ID. n° 5.
- 35 Punto 15. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 80% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una
- 40 cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8); y en donde los dominios de complementariedad de la cadena ligera y los dominios de complementariedad de la cadena pesada conservan capacidad de unión de Mac-1.
- 45 Punto 16. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una
- 50 cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7), y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8); y

en donde los dominios de la complementariedad de la cadena ligera y los dominios de la complementariedad de la cadena pesada conservan capacidad de unión de Mac-1.

5 Punto 17. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3) y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8); y en donde los dominios de complementariedad de la cadena ligera y dominios de complementariedad de la cadena pesada conservan capacidad de unión de Mac-1.

15 Punto 18. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una cadena ligera con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3), y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una cadena pesada con tres regiones determinantes de la complementariedad que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8); y en donde los dominios de complementariedad de la cadena ligera y dominios de complementariedad de la cadena pesada conservan capacidad de unión de Mac-1.

Punto 19. Un método para aliviar un síntoma de una patología relacionada con el enlace de Mac-1 a la fibrina o el enlace de Mac-1 al fibrinógeno, comprendiendo el método administrar el anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 18 a un sujeto en el que se desea dicho alivio de en una cantidad suficiente para aliviar el síntoma de la patología en el sujeto.

25 Punto 20. El procedimiento del punto 19, en donde el sujeto es un humano.

Punto 21. El procedimiento del punto 19, en donde dicha patología se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, artritis reumatoide y cáncer.

30 Punto 22. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Punto 23. Un equipo que comprende el anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 18.

Punto 24. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina, CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ. ID. n° 18) o uno de sus derivados biológicamente activos.

Punto 25. Una célula que comprende el vector del punto 24.

35 Punto 26. Un método de generación de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina, o a uno de sus derivados biológicamente activo, comprendiendo el procedimiento: administrar a un sujeto una primera dosis de la célula del punto 23, en donde la primera dosificación es suficiente para generar una respuesta inmunitaria en dicho sujeto.

40 Punto 27. El procedimiento del punto 26, que comprende además la etapa de administración a dicho paciente de una segunda dosis de dicha célula, en donde dicha segunda dosis es suficiente para generar una respuesta inmunitaria en dicho sujeto.

Punto 28. El método de cualquiera de los puntos 26 a 27, en donde el anticuerpo producido inhibe el enlace fibrina/Mac-1 en dicho sujeto.

45 Punto 29. Un procedimiento de detección sistemática de un ligando que se une a un receptor Mac-1 y modula la actividad del receptor Mac-1, comprendiendo el método: (a) proporcionar el anticuerpo del punto 1; (b) poner en contacto un epítipo de $\gamma^{377-395}$ de fibrina CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ. ID. n° 18), o uno de sus derivados biológicamente activos, y formar un complejo anticuerpo/polipéptido; (c) poner en contacto el complejo anticuerpo/polipéptido con una composición que comprende un compuesto experimental; y (d) determinar si el compuesto experimental se une al anticuerpo monoclonal; con lo que, la unión del compuesto experimental indica que dicho compuesto experimental es un ligando que modula la actividad del receptor Mac-1.

50

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Regents of the University of California Akassoglou, Katerina

5 <120> Anticuerpos monoclonales

<130> RUC-110WO

<150> US 61/248,014

10 <151> 02-10-2009

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 158

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 1

Thr Phe Asp Ser Pro Tyr Gln Val Arg Arg Met Arg Phe Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro Gly Ser Thr Ala Asp Ile
 20 25 30

Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Ile Thr Leu Gly Thr Ser
 35 40 45

Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Ser Gly
 50 55 60

Ile Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg
 85 90 95

Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg
 100 105 110

Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu
 115 120 125

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 130 135 140

Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr Lys Gly Glu Phe
 145 150 155

<210> 2

ES 2 614 939 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5
 <400> 2
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Ser Gly Ile Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

10
 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15
 <400> 3
 Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

20
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

25
 <210> 5
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30
 <400> 5
 Asn Thr Ala Phe Ala Gly Phe Gly Arg Asn Met Arg Ser Leu Phe Ser
 1 5 10 15

Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Ala Met Gly Trp Ser Cys Ile
 20 25 30

Ile Val Leu Leu Val Ser Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln
 35 40 45

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys
 50 55 60

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
 65 70 75 80

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
 85 90 95

ES 2 614 939 T3

Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys
 100 105 110

Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 115 120 125

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser
 130 135 140

Asp Pro Thr Gly Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Pro
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Thr Pro Pro
 165

5 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 6
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
 1 5 10

15 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 7
 Leu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 8
 Ser Asp Pro Thr Gly Cys
 1 5

30 <210> 9
 <211> 474
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 9

ES 2 614 939 T3

acttttgact caccatatca agttcgcaga atgaggttct ctgctcagct tctggggctg 60
cttgtgctct ggatccctgg atccactgca gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc 120
aatccaatca ctcttggaac atcagcttcc atgtcctgca ggtctagtaa gagtctccta 180
catagtagtg gcatcactta tttgtcttgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 240
ctcctgattt atcagatgtc caaccttgcc tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt 300
gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatt agccgagtgg aggctgagga tgtgggtgtt 360
tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg ctcacgttcc gtgctgggac caagctggag 420
ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta tccgcatgca ccaagggcga attc 474

<210> 10
<211> 499
5 <212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 10
gaacactgcg tttgctggct ttggaagaaa catgagatca ctgttctctc tacagttact 60
gagcacacag gacctcgcca tgggatggag ctgtatcatt gtcctcttgg tatcaacagc 120
tacaggtgtc cactcccagc tccaactgca gcagcctggg gctgagctgg tgaggcctgg 180
gacttcagtg aagttgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccagct actggataca 240
ctgggtaaag cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatc ggactgattg atccttctga 300
tagttatact aactacaatc aaaagttcag gggcaaggcc acattgactg tagacacatc 360
ctccagcaca gcctacatgc agctcagcag cctgacatct gaggactctg cggcttatta 420
ctgtgcaagc tccgatccta caggctgctg gggccaaggc accactctca cagtctcccc 480
agctagcaca acacccccca 499

10 <210> 11
<211> 48
<212> DNA
<213> Mus musculus

15 <400> 11
aggctagta agagtctct acatagtagt ggcatcactt attgtct 48

20 <210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

25 <400> 12
cagatgtcca acctgcctc a 21

30 <210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 13
gctcaaaatc tagaacttcc gctcacg 27

35 <210> 14

ES 2 614 939 T3

<211> 30
<212> DNA
<213> Mus musculus

5 <400> 14
ggctacacct tcaccagcta ctggatacac 30

<210> 15
<211> 51
10 <212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 15
15 ctgattgatc cttctgatag ttatactaac tacaatcaaa agttcagggg c 51

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
20 <213> Mus musculus

<400> 16
tccgatccta caggctgc 18

<210> 17
<211> 14
25 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17
30 Cys Gly Trp Thr Val Leu Gln Lys Arg Ile Asp Gly Ser Leu
1 5 10

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
35 <213> Mus musculus

<400> 18
Cys Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn Arg Leu Thr Ile
1 5 10 15

Gly

40

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a un epítipo de $\gamma^{377-395}$ del dominio γC de fibrina o fibrinógeno, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3) y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con las secuencias GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7), y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8), en donde el anticuerpo tiene capacidad para inhibir el enlace Mac-1 a fibrina o fibrinógeno, y en donde el anticuerpo suprime los síntomas clínicos de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en el momento de la recaída.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo inhibe el enlace de Mac-1 al dominio γC de fibrina o fibrinógeno.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo presenta más del 20% de inhibición de adhesión de la microglía al dominio γC de fibrina o fibrinógeno.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo presenta más del 50% de inhibición del enlace de Mac-1 al dominio γC de fibrina o fibrinógeno.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3) y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) o/y una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8).
7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos SEQ. ID. n° 1 variable de la cadena ligera y/o una secuencia de aminoácidos SEQ. ID. n° 5 variable de la cadena pesada.
8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos RSSKSLHSSGITYLS (SEQ. ID. n° 2), QMSNLAS (SEQ. ID. n° 3) y AQNLELPLT (SEQ. ID. n° 4) y una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos GYTFTSYWIH (SEQ. ID. n° 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ. ID. n° 7) y SDPTGC (SEQ. ID. n° 8).
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho anticuerpo comprende, en cada caso, una secuencia de aminoácidos SEQ. ID. n° 1 variable de la cadena ligera.
10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su empleo en el tratamiento de una patología relacionada con el enlace de Mac-1 a la fibrina o el enlace de Mac-1 al fibrinógeno, en donde dicha patología se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cicatrización de heridas, isquemia pulmonar, lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, artritis reumatoide y cáncer.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un equipo que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, e instrucciones para usar el equipo para detectar fibrina en una muestra.

FIG. 1

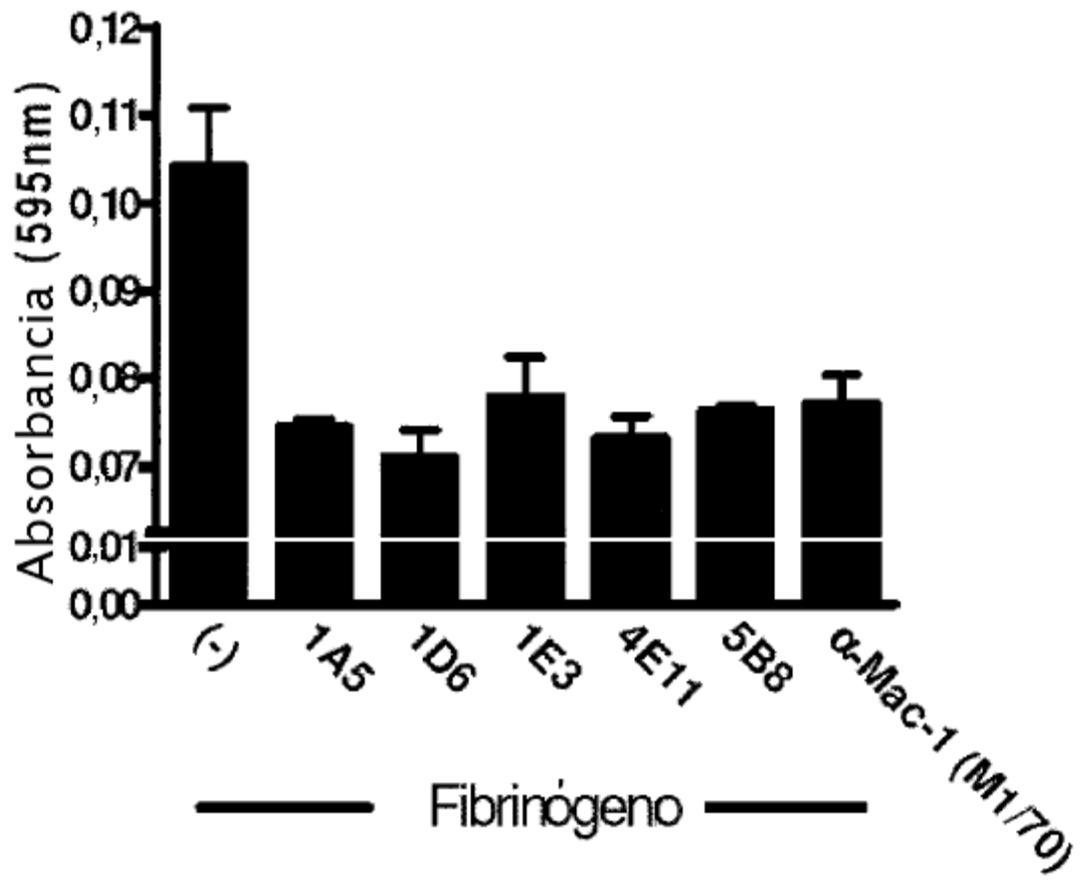


FIG. 2

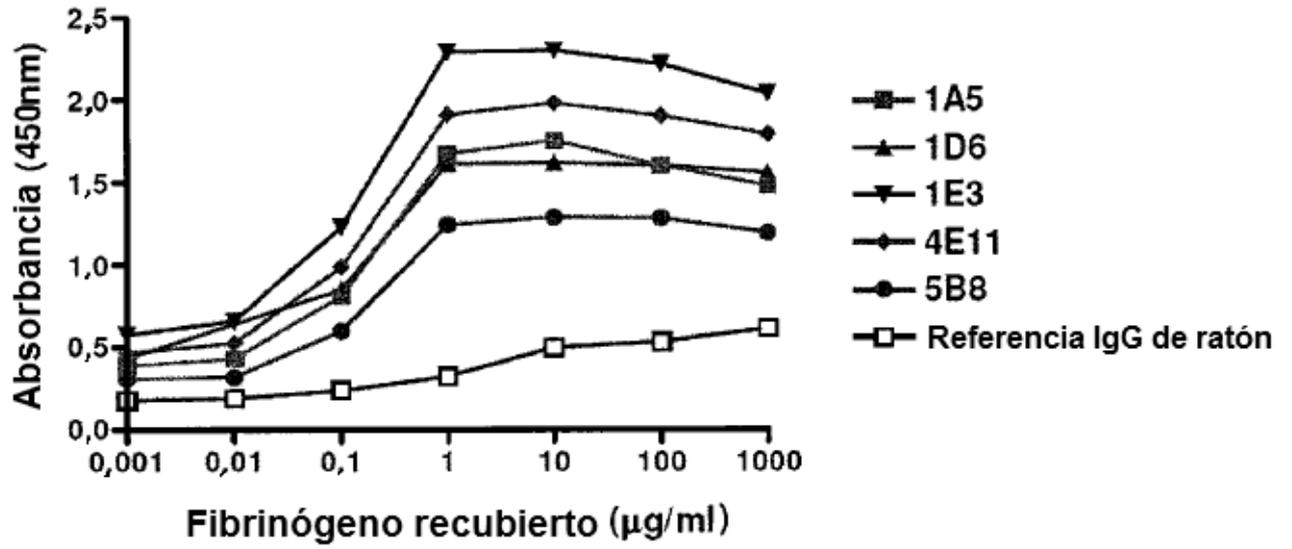


FIG. 3

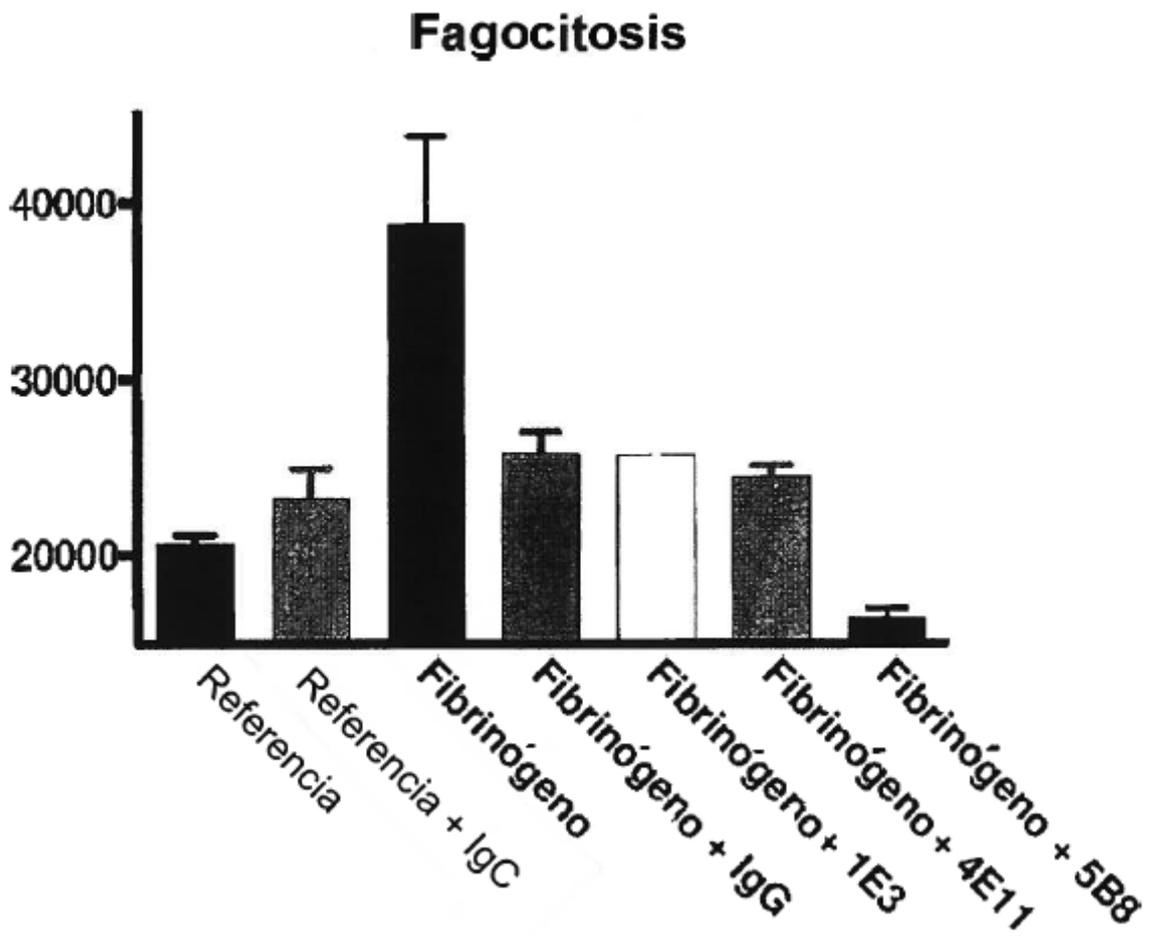


FIG. 4A

Anticuerpo de fibrina 4E11 EAE

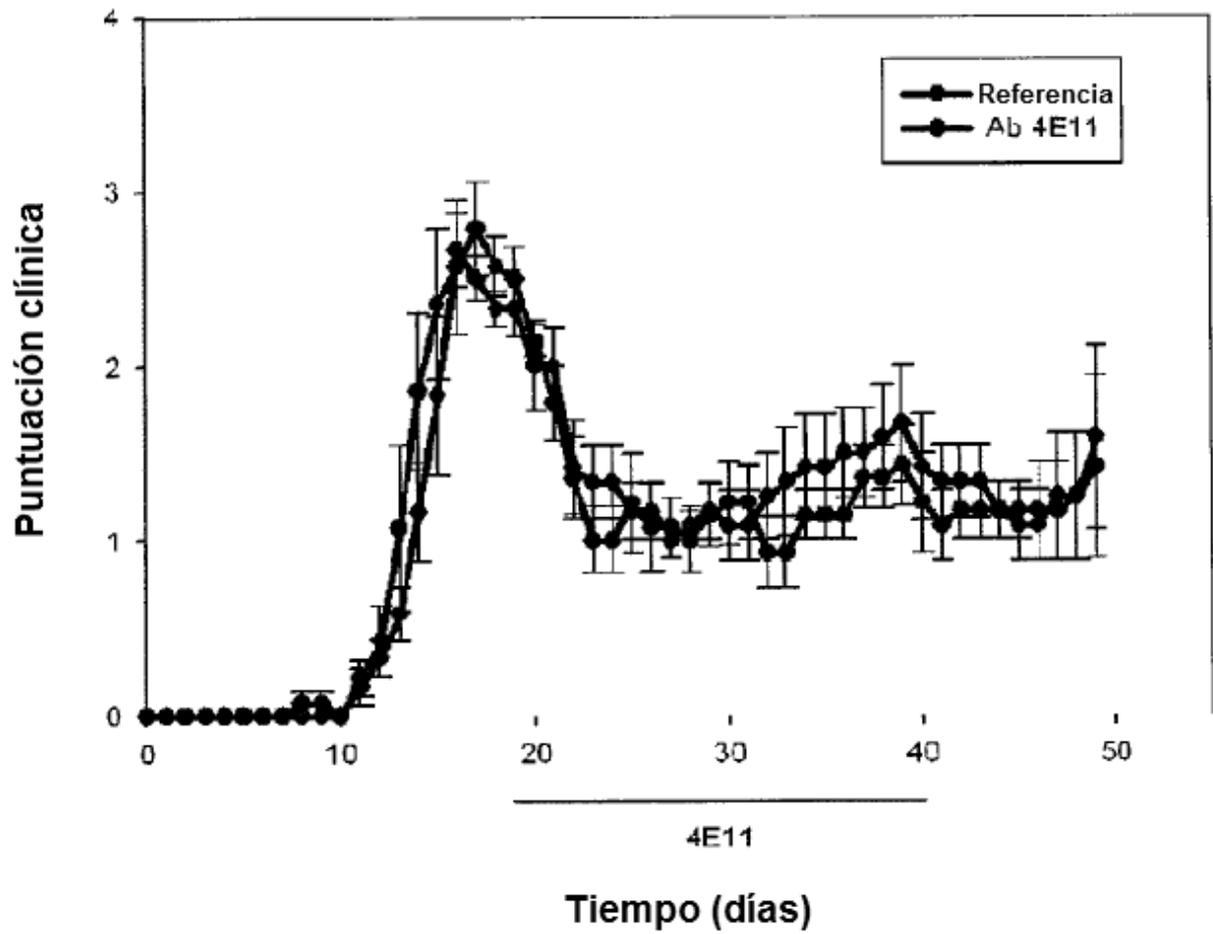


FIG. 4B

Anticuerpo de fibrina terapéutico EAE

