

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 718**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/GB2012/053140**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13088164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12806641 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2791177**

54 Título: **Moléculas de anticuerpos que se unen a la trombina y usos de las mismas**

30 Prioridad:

14.12.2011 GB 201121513

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

17.11.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 08560, US**

72 Inventor/es:

**HUNTINGTON, JAMES ANDREW;
BAGLIN, TREVOR y
LANGDOWN, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 642 718 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

Moléculas de anticuerpos que se unen a la trombina y usos de las mismas

5 La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpos que inhiben la trombina.

La coagulación sanguínea es un proceso clave en la prevención del sangrado de los vasos sanguíneos dañados (hemostasia). Sin embargo, un coágulo sanguíneo que obstruya el flujo de la sangre a través de un vaso (trombosis) o que se desprenda y se aloje en cualquier vaso del cuerpo (tromboembolia) puede ser un peligro serio para la salud.

Hay disponibles varias terapias anticoagulantes para tratar la coagulación sanguínea patológica. Un inconveniente de estas terapias es un aumento del riesgo de hemorragias (Mackman (2008) Nature 451(7181): 914-918). Muchos agentes anticoagulantes tienen una ventana terapéutica estrecha entre la dosis que previene la trombosis y la dosis que induce la hemorragia. Esta ventana a menudo está restringida adicionalmente por variaciones de la respuesta de paciente individuales.

La presente invención se refiere al hallazgo sorprendente de que las moléculas de anticuerpo que reconocen el epítipo exosito 1 de la trombina inhiben selectivamente la trombina sin promover hemorragias. Estas moléculas de anticuerpo pueden ser útiles en el tratamiento y prevención de trombosis, embolia y otras afecciones mediadas por la trombina.

Un aspecto de la invención proporciona una molécula de anticuerpo aislada que se une específicamente al exosito 1 de la trombina, en el que la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH que comprende unas HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y un dominio VL que comprende una LCDR2 y una LCDR3 que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente, y una LCDR1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 7 o una LCDR1 que tiene la SEQ ID NO: 7 en la que el sitio de glicosilación está mutado mediante la introducción de una sustitución en un resto de aminoácido que corresponde con el S30 de la SEQ ID NO: 6.

Las moléculas de anticuerpo anti-exosito 1 aisladas pueden inhibir la trombina in vivo sin promover o sin promover sustancialmente el sangrado o hemorragia, es decir, las moléculas de anticuerpo no inhiben o no inhiben sustancialmente las respuestas fisiológicas frente a una lesión vascular (es decir, la hemostasia). Por ejemplo, la hemostasia puede no inhibirse o se inhibe mínimamente por las moléculas de anticuerpo (es decir, se inhibe en un grado insignificante que no afecta al bienestar del paciente o no necesita una intervención adicional). El sangrado puede no estar aumentado o puede estar aumentando mínimamente por las moléculas de anticuerpo.

El exosito 1 (también conocido como 'exosito 1 de unión aniónica' y el 'exosito de reconocimiento del fibrinógeno') es un sitio de unión secundario bien caracterizado en la molécula de trombina (véase, por ejemplo, James A. Huntington, 2008, Structural Insights into the Life History of Thrombin, in Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008, editores; K. Tanaka y E.W. Davie, Springer Japan KK, Tokyo, pp. 80-106). El exosito 1 se forma en la trombina madura pero no se forma en la protrombina (véase por ejemplo, Anderson et al (2000) JBC 2775 16428-16434).

El exosito 1 está implicado en el reconocimiento de sustratos de la trombina tales como el fibrinógeno, pero está alejado del sitio catalítico activo. Distintos factores de unión a la trombina se unen al exosito 1, incluyendo el dodecapéptido hirugen anticoagulante (Naski et al 1990 JBC 265 13484-13489), factor V, factor VIII, trombomodulina (co-factor para la proteína C y la activación de TAFI), fibrinógeno, PAR1 y fibrina (el cofactor para la activación del factor XIII). Wu et al (1994 JBC 269: 3725-3730) caracteriza el epítipo de un anticuerpo específico del exosito de la trombina que se ha descubierto que inhibe la coagulación de fibrinógeno y las actividades de unión a la trombomodulina de la trombina que se aisló de un paciente con trombosis arterial recurrente. ARNAUD E ET AL: "An autoantibody directed against human thrombin anion-binding exosite in a patient with arterial thrombosis: Effects on platelets, endothelial cells, and protein C activation", BLOOD 19940915 US, vol. 84, nº 6, 15 Septiembre 1994 (1994-09-15), páginas 1843-1850 exponen un autoanticuerpo dirigido contra el exosito de unión aniónica de la trombina humano en un paciente con trombosis arterial, en el que dicho Ab inhibe todas las interacciones de la trombina que necesitan un sitio de unión secundario sin interferir con el sitio catalítico (resumen). Desvela un Ab contra el exosito de unión aniónica de la trombina humana aislado de pacientes, inhibiendo el Ab específicamente la agregación plaquetaria inducida por la trombina. El epítipo reconocido por el Ab engloba His 66, Arg 68, Arg 70, Por 23, Glu 24, Glu 25 de la cadena B de la trombina. El Ab retrasaba todas las acciones procoagulantes de la trombina tales como la formación de fibrina y la agregación plaquetaria, pero también la producción de PGI2 por las células endoteliales. El Ab también inhibe la activación de proteínas por la trombina en presencia de trombomodulina.

CHANG A C ET AL: "The reaction of thrombin with platelet-derived nexin requires a secondary recognition site in addition to the catalytic site", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 177, nº 3, 28 de Junio de 1991 (1991-06-28), páginas 1198-1204 desvela un anticuerpo monoclonal EST-6 que bloquea las reacciones de trombina que implican el exosito de unión aniónica. El

Ab inhibe la acción de la trombina sobre el fibrinógeno pero no inhibe la actividad amidolítica. El Ab reacciona con Arg 75-Arg 77a de la cadena B de la trombina.

5 QUINGYU WU ET AL: "ACTIVATION-INDUCED EXPOSURE OF THE THROMBIN ANION-BINDING EX-OSITE. ÖINTERACTIONS OF RECOMBINANT MUTANT PROTHROMBINS WITH THROMBOMODULIN AND A THROMBIN EXOSITE-SPECIFIC ANTIBODY", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 269, nº 5, 4 Febrero 1994 (1994-02-04), páginas 3725-3730 desvelan un autoanticuerpo de un paciente con trombosis arterial recurrente que inhibe la coagulación del fibrinógeno y las actividades de unión de la trombomodulina de la trombina, sugiriendo que el Ab reconoce un epítipo exosito en la trombina. Dicho Ab inhibe la interacción de la trombina con el fibrinógeno y la trombomodulina pero no la actividad amidolítica de la trombina.

15 Un anticuerpo anti-exosito de la invención se une al exosito 1 de la trombina humana madura. La secuencia de preprotrombina humana se expone en la SEQ ID NO: 1. La protrombina humana tiene la secuencia de los restos 44 a 622 de la SEQ ID NO: 1. La trombina humana madura tiene la secuencia de los restos 314-363 (cadena ligera) y los restos 364 a 622 (cadena pesada).

20 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-exosito 1 también se puede unir al exosito 1 de la trombina madura de otras especies. Las secuencias de trombina de otras especies se conocen en la técnica y están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Lo restos correspondientes de las secuencias de trombina de otras especies se pueden identificar fácilmente utilizando herramientas de alineamiento de secuencias.

25 El esquema de numeración de los restos de trombina que se exponen en el presente documento es convencional en la técnica y se basa en el armazón de la quimotripsina (Bode W et al EMBO J. 1989 Nov; 8(11):3467-75). La trombina tiene bucles de inserción relacionados con la quimotripsina que se representan con letras secuencialmente utilizando letras minúsculas.

30 El exosito 1 de la trombina humana madura está subrayada en la SEQ ID NO: 1 y puede incluir los siguientes restos: M32, F34, R35, K36, S36a, P37, Q38, E39, L40, L65, R67, S72, R73, T74, R75, Y76, R77a, N78, E80, K81, I82, S83, M84, K109, K110, K149e, G150, Q151, S153 y V154. En algunas realizaciones, otros restos de trombina que se localizan cerca de (es decir, a 0,5 nm o a 1 nm) de uno cualquiera de estos restos se pueden considerar que son parte del exosito 1. Un anticuerpo anti-exosito 1 se puede unir a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de 20 restos de exosito 1. Preferentemente, un anticuerpo anti-exosito 1 se une a un epítipo que consiste completamente de restos de exosito 1.

35 Por ejemplo, un anticuerpo anti-exosito 1 se puede unir a un epítipo que puede unirse a un epítipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o los 16 restos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en M32, F34, S36a, P37, Q38, E39, L40, L65, R67, R73, T74, R75, Y76, R77a, I82 y Q151 de la trombina humana o los restos de trombina equivalentes de otras especies. En algunas realizaciones preferidas, el epítipo puede comprender los restos de trombina Q38, R73, T74, Y76 y R77a y opcionalmente uno o más restos adicionales.

45 Las moléculas de anticuerpo anti-exosito 1 como se describe en el presente documento son específicos del exosito 1 de la trombina y se unen a este epítipo con alta afinidad con respecto a otros epítopos, por ejemplo, epítopos de proteínas de mamífero distintas de la trombina madura. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 puede presentar una afinidad de unión por el exosito 1 de la trombina con al menos 500 veces, al menos 1000 veces, o al menos 2000 veces mayor que por los otros epítopos.

50 Preferentemente, una molécula de anticuerpo como se describe en el presente documento que es específica del exosito 1 se puede unir a la trombina madura pero no presentar uniones ni unirse sustancialmente a la protrombina.

55 Sin quedar unidos por teoría alguna, los anticuerpos anti-exosito 1 pueden ser incapaces de acceder a la trombina en el centro de un coágulo hemostático, y por lo tanto son incapaces de afectar la hemostasia interrumpiendo la función normal de la trombina en los sitios de lesión vascular. Sin embargo, debido a que los anticuerpos anti-exosito 1 se siguen uniendo a la trombina en la superficie del coágulo y en la cubierta externa del coágulo, se evita la trombosis, es decir, se evita la extensión del coágulo no hemostático.

60 Una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 puede tener una constante de disociación para el exosito 1 de menos de 50 nM, menos de 40 nM, menos de 30 nM, menos de 20 nM, menos de 10 nM, o menos de 1 nM. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede tener una afinidad para el exosito 1 de 0,1 a 50 nM, por ejemplo, 0,5 a 10 nM. Una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 adecuada puede, por ejemplo, tener una afinidad para el exosito 1 de la trombina de aproximadamente 1 nM.

65 La cinética de unión y la afinidad (expresada como la constante de disociación en equilibrio, K_d) de las moléculas de anticuerpo anti-exosito 1 se puede determinar utilizando técnicas convencionales, tales como la resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, utilizando un análisis BIAcore.

Una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento puede ser una inmunoglobulina o un fragmento de la misma, y puede producirse naturalmente o de manera parcial o completamente sintética.

5 Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 pueden incluir cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, incluyendo Fab, Fab₂, Fab₃, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y anticuerpos de dominio sencillo, incluyendo los nanocuerpos, así como anticuerpos completos de cualquier isotipo o sub-clase. Las moléculas de anticuerpo y los métodos para su construcción y uso, se describen, por ejemplo, en Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 (2005).

10 En algunas realizaciones preferidas, la molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede ser un anticuerpo completo. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede ser una IgG, IgA, IgE, o IgM o cualquiera de las sub-clases de isotipo, particularmente IgG1, e IgG4. Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 pueden ser anticuerpos monoclonales. En otras realizaciones preferidas, la molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede ser un fragmento de anticuerpo.

15 Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos.

20 Las moléculas de anticuerpo anti-exositio como se describen en el presente documento se pueden aislar, en el sentido de estar libres de contaminantes, tales como anticuerpos capaces de unirse con otros polipéptidos y/o componentes del suero. Los anticuerpos monoclonales son preferidos para algunos propósitos, aunque también se pueden emplear los anticuerpos policlonales.

25 Las moléculas de anticuerpos anti-exositio 1 se pueden obtener utilizando técnicas que son convencionales en la técnica. Los métodos de producción de anticuerpos incluyen la inmunización de un mamífero (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con la proteína o un fragmento de la misma. Los anticuerpos se pueden obtener a partir de los animales inmunizados utilizando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, y exploradas, preferentemente utilizando la unión del anticuerpo al antígeno de interés. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de transferencia de Western o inmunoprecipitación (Armitage et al., 1992, Nature 357: 80-82). El aislamiento de los anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos de un animal puede acompañarse de una etapa de sacrificio del animal.

30 Como alternativa o suplemento a la inmunización de un mamífero con un péptido, se puede obtener un anticuerpo específico de una proteína a partir de una biblioteca producida recombinantemente de dominios variables de inmunoglobulina expresados, por ejemplo, utilizando bacteriófagos lambda o bacteriófagos filamentosos que presentan dominios de unión a inmunoglobulinas funcionales en sus superficies; por ejemplo véase el documento WO 92/01047. La biblioteca puede estar intacta, que está construida con secuencias obtenidas de un organismo que no se ha inmunizado con ninguna de las proteínas (o fragmentos), o puede estar construida utilizando secuencias obtenidas de un organismo que se ha expuesto al antígeno de interés.

40 Otras moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 se pueden identificar explorando el suero de pacientes en cuanto a anticuerpos que se unan al exositio 1.

45 En algunas realizaciones, las moléculas de anticuerpo anti-trombina se puede producir por cualquier medio conveniente, por ejemplo, u método descrito anteriormente, y después explorando por unión diferencial a la trombina madura con respecto a la trombina con una mutación de exositio 1, gamma trombina (exositio 1 deficiente debido a autólisis en R75 y R77a) o protrombina. Los métodos de exploración adecuados son bien conocidos en la técnica.

50 Un anticuerpo que presenta un aumento de unión con la trombina madura, con respecto a las proteínas no trombinas, trombina con una mutación exositio 1, gamma trombina, o protrombina, por ejemplo un anticuerpo que se une a la trombina madura pero no se une a la trombina con una mutación exositio 1, gamma trombina o protrombina, se puede identificar como una molécula de anticuerpo anti-exositio 1.

55 Tras la producción y/o aislamiento, se puede ensayar la actividad biológica de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1. Por ejemplo, se puede determinar la capacidad de la molécula de anticuerpo para inhibir un sustrato de trombina, cofactor o unión del inhibidor o escisión por la trombina y/o se puede determinar la capacidad de la molécula de anticuerpo para inhibir la trombosis sin promover el sangrado.

60 Las moléculas de anticuerpo adecuadas se pueden ensayar en cuanto a la actividad utilizando un ensayo de coagulación de fibrinógeno o tiempo de trombina. Los ensayos adecuados son bien conocidos en la técnica.

65 El efecto de una molécula de anticuerpo sobre la coagulación y el sangrado se puede determinar utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, el efecto de una molécula de anticuerpo sobre la trombosis se puede determinar en un modelo animal, tal como un modelo de ratón con coágulos en los vasos sanguíneos inducidos por cloruro férrico. Los efectos sobre la hemostasia también se pueden determinar en un modelo animal, por ejemplo, midiendo la hemorragia en la cola de un ratón.

Las moléculas de anticuerpo comprenden normalmente un dominio de unión al antígeno que comprenden un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL), aunque los dominios de unión al antígeno que comprenden solo un dominio variable de cadena pesada (VH) también son posibles (por ejemplo, anticuerpos de camélidos o de tiburón).

5 Cada uno de los dominios VH y VL comprenden normalmente tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) responsables de la unión al antígeno, con regiones marco conservadas intercaladas.

10 En algunas realizaciones, la unión al exosito 1 puede producirse completa o sustancialmente mediante la VHCDR3 de la molécula de anticuerpo anti-exosito 1.

15 Una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 de la presente divulgación puede comprender un dominio VH que comprende una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o la secuencia de SEQ ID NO: 5 con 1 o más, por ejemplo 2, 3, 4 o 5 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras. La HCDR3 puede comprender los aminoácidos de las posiciones 4 a 9 de la SEQ ID NO: 5 (SEFEPF), o más preferentemente los restos de aminoácidos de las posiciones 2 y 4 a 10 de la SEQ ID NO: 5 (D y SEFEPFS) con sustituciones, eliminaciones o inserciones en una o más de otras posiciones de la SEQ ID NO: 5. La HCDR3 puede ser la única región de la molécula de anticuerpo que interactúe con un epítipo exosito 1 de la trombina o sustancialmente la única región. La HCDR3 puede determinar por lo tanto la especificidad y/o afinidad de la molécula de anticuerpo para la región de exosito 1 de la trombina.

25 El dominio VH de una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 de la presente divulgación puede comprender adicionalmente una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o la secuencia de SEQ ID NO: 4 con 1 o más, por ejemplo 2, 3, 4 o 5 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. La HCDR2 puede comprender los restos de aminoácidos en las posiciones 3 a 7 de la SEQ ID NO: 4 (DPQDQG) o los restos de aminoácidos de las posiciones 2 y 4 a 7 de la SEQ ID NO: 4 (L y PQDQG) de la SEQ ID NO: 4, con sustituciones, eliminaciones o inserciones en una o más de otras posiciones de la SEQ ID NO: 4.

30 El dominio VH de la molécula de anticuerpo anti-exosito 1 de la presente divulgación puede comprender una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o la secuencia de SEQ ID NO: 3 con 1 o más, por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. La HCDR1 puede comprender un resto de aminoácido T en la posición 5 de la SEQ ID NO: 3 con sustituciones, eliminaciones o inserciones en una o más de otras posiciones de la SEQ ID NO: 3.

35 La molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 que tiene las secuencias de SEQ ID NO: 3, 4 y 5 respectivamente. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de SEQ ID NO: 2 con 1 o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

40 La molécula de anticuerpo anti-exosito 1 comprende adicionalmente un dominio VL, por ejemplo un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que tiene las secuencias de SEQ ID NO: 7, 8 y 9 respectivamente. Un dominio VL de la presente divulgación puede comprender las secuencias de las SEQ ID NO: 7, 8 y 9 respectivamente, con, independientemente, 1 o más, por ejemplo 2, 3, 4 o 5 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VL que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6 o la secuencia de SEQ ID NO: 6 con 1 o más, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

50 En algunas realizaciones, el dominio VL puede comprender la Tyr 49.

La molécula de anticuerpo anti-exosito 1 puede comprender por ejemplo una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos que mejoran una o más propiedades del anticuerpo, por ejemplo, la afinidad, la semivida funcional, tasa de activación y anulación.

55 Las técnicas necesarias con el objetivo de introducir sustituciones, eliminaciones o inserciones en las secuencias de aminoácidos de las CDR dominios VH o VL de anticuerpo y anticuerpos están disponibles en general en la técnica. Las secuencias variantes se pueden producir, con sustituciones, eliminaciones o inserciones que pueden preverse o no que tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y ensayarse para su capacidad para unirse al exosito 1 de la trombina y/o en cuanto a cualquier otra propiedad deseada.

60 En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo anti-exosito 1 puede comprender un dominio VH que comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y un dominio VL que comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente.

65

Por ejemplo, los dominios VH y VL puede tener la secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 respectivamente; o pueden tener las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 que comprenden, independientemente, 1 o más, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras.

5 En algunas realizaciones, un anticuerpo puede comprender una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones que retiran un sitio de glicosilación. Por ejemplo, un sitio de glicosilación en el dominio VL de la SEQ ID NO: 6 se puede mutar introduciendo una sustitución en N28 o S30.

10 La molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede estar en cualquier formato, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede ser un anticuerpo completo, por ejemplo una IgG, tal como IgG1 o IgG4, IgA, IgE o IgM.

15 Una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 de la invención puede ser la que compite por la unión al exositio 1 con una molécula de anticuerpo descrita anteriormente, por ejemplo una molécula de anticuerpo que

(i) se une al exositio 1 de la trombina y

(ii) comprende un dominio VH de SEQ ID NO: 2 y/o un dominio VL de SEQ ID NO: 6; una HCDR3 de SEQ ID NO: 5; una HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2, o LCDR3 de SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8 o 9 respectivamente; un dominio VH que comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NO: 3, 4 y 5 respectivamente; y/o un dominio VH que comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NO: 3, 4 y 5 y un dominio VL que comprende las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NO: 7, 8 y 9 respectivamente.

25 La competición entre las moléculas de anticuerpo pueden ensayarse fácilmente in vitro, por ejemplo, utilizando ELISA y/o marcando una molécula indicadora específica de una molécula de anticuerpo que se pueda detectar en presencia de una o más moléculas de anticuerpo sin marcar, para hacer posible la identificación de moléculas de anticuerpo que se unen al mismo epítipo o un epítipo solapado. Dichos métodos se conocen fácilmente por un experto habituado en la técnica. Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo que compite con una molécula de anticuerpo, por ejemplo una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y/o VL, una CDR, por ejemplo, la HCDR3 o un grupo de CDR del anticuerpo parental descrito anteriormente para la unión al exositio 1 de la trombina. Una molécula de anticuerpo adecuada puede comprender un sitio de unión al antígeno del anticuerpo que compite con un sitio de unión al antígeno del anticuerpo para la unión al exositio 1 donde el sitio de unión al antígeno del anticuerpo está compuesto por un dominio VH y un dominio VL, y donde los dominios VH y VL comprenden las secuencias de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 y secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de las SEQ ID NO: 7, 8 y 9 respectivamente, por ejemplo los dominios VH y VL de las SEQ ID NO: 2 y 6.

40 Una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento puede inhibir la unión de factores de unión a la trombina incluyendo factores que se unen al exositio 1. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede inhibir la unión competitiva o no competitivamente de uno o más de FV, FVIII, trombomodulina fibrinógeno o fibrina, PAR1 y/o hirugen y análogos de la hirudina con la trombina.

45 Una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento puede inhibir una o más actividades de la trombina. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede inhibir la escisión hidrolítica de uno o más sustratos de trombina, tal como el fibrinógeno el receptor de plaquetas PAR-1 y el factor FVIII de coagulación. Por ejemplo, la unión de la molécula de anticuerpo a la trombina puede dar como resultado una disminución de al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 15 veces en la hidrólisis del fibrinógeno, PAR-1, factor de coagulación FVIII y/u otros sustratos de la trombina, tal como el factor V, el factor XIII en presencia de fibrina y la proteína C y/o TAFI en presencia de trombomodulina. En algunas realizaciones, la unión de la trombina por la molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede dar como resultado una escisión no detectable del sustrato de la trombina por la trombina.

55 Las técnicas para medir la actividad de la trombina, por ejemplo, midiendo la hidrólisis de los sustratos de trombina in vitro son convencionales en la técnica y se describen en el presente documento.

Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 se pueden modificar adicionalmente por modificación química, por ejemplo mediante PEGilación o mediante incorporación en un liposoma, para mejorar sus propiedades farmacéuticas, por ejemplo aumentando su semivida in vivo.

60 El efecto de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 sobre la coagulación y el sangrado se puede determinar utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, se puede determinar el efecto de un anticuerpo en un modelo de trombosis. Los modelos adecuados incluyen la inducción de un coágulo en los vasos sanguíneos con cloruro férrico en un modelo murino, seguido por sangrado de la cola para ensayar la hemostasia normal. Otros modelos de trombosis adecuados se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Westrick et al ATVB (2007) 27:2079-2093).

Las moléculas de anticuerpo anti-exosito 1 pueden estar comprendidas en composiciones farmacéuticas con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un compuesto o combinación de compuestos que se meten en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias que reacciona y que permite, por ejemplo, la facilitación de la administración de la molécula de anticuerpo anti-exosito 1, un aumento en su periodo de vida y/o en su eficacia en el cuerpo o un aumento de su solubilidad en solución. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen bien y serán adaptadas por el experto en la técnica en función del modo de administración de la molécula de anticuerpo anti-exosito 1.

10 En algunas realizaciones las moléculas de anticuerpo anti-exosito 1 pueden proporcionarse en forma liofilizada para su reconstitución antes de la administración. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo liofilizadas puede reconstituirse en agua estéril y mezclarse con solución salina antes de la administración a un individuo.

15 Las moléculas de anticuerpo anti-exosito 1 se administrarán habitualmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además de la molécula de anticuerpo anti-exosito 1, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante farmacéuticamente aceptable, u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir en la eficacia de la molécula de anticuerpo anti-exosito 1. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser como embolada, infusión, inyección o cualquier otra vía adecuada, como se expone posteriormente.

25 Para la administración parenteral, por ejemplo subcutánea o intravenosa, por ejemplo, por inyección, la composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo anti-exosito 1 puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas que utilizan, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como el cloruro sódico para inyección, solución de Ringer, solución de lactato de Ringer. Se pueden emplear conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según sea necesario incluyendo tampones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, butil o bencil alcohol, alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol), polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas tales como la seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrina, agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares tales como la sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

40 Una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección que se va a tratar.

45 Una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 como se describe en el presente documento se puede utilizar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal incluyendo un tratamiento profiláctico o preventivo (por ejemplo, un tratamiento antes de la aparición de una afección en un individuo para reducir el riesgo de que se produzca la afección en el individuo; retrasar su aparición, o reducir su gravedad tras la aparición). El método de tratamiento puede comprender la administración de una molécula de anticuerpo anti-exosito 1 a un individuo que necesita el mismo.

50 La administración es normalmente de una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo suficiente para mostrar un beneficio en un paciente. Dicho beneficio puede será la menos una mejora de al menos un síntoma. La cantidad actual administrada, y la tasa y curso en el tiempo de la administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de la que se esté tratando, el mamífero en particular que se va a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro de la composición, el método de administración, el calendario de administración y otros factores conocidos por los médicos encargados. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones de la dosificación, etc., es responsabilidad de los médicos encargados en general y otros doctores médicos y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de la enfermedad que se va a tratar. Las dosis apropiadas de las moléculas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica (Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Se pueden utilizar las dosificaciones específicas que pueden indicarse en el presente documento o en la Physician's Desk Reference (2003) según sean apropiadas para el tipo de medicamento que se va a administrar. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de una molécula de anticuerpo se puede determinar comparando su actividad in vitro con su actividad in vivo en un modelo animal. Los métodos para la extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a los seres humanos son conocidos. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo si el anticuerpo es para la prevención o para el tratamiento, el

tamaño y la localización del área a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo completo, in fragmento) y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo.

5 Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 100 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis de carga más alta inicial, seguida por una o más dosis más bajas. Normalmente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, por ejemplo del isotipo IgG1 o IgG4. Esta es una dosis para un tratamiento único de un paciente adulto, que se puede ajustar proporcionalmente para niños y bebés, y también se ajusta para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir a intervalos diarios, de dos veces a la semana, semanales o mensuales, a discreción del médico. El calendario de tratamiento para un individuo puede depender de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la composición de anticuerpo, la vía de administración y la naturaleza de la afección que se va a tratar.

15 El tratamiento puede ser periódico, y el periodo entre administraciones puede ser de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo de aproximadamente tres semanas o más, de aproximadamente cuatro semanas o más, de aproximadamente una vez al mes o más, de aproximadamente cinco semanas o más o de aproximadamente seis semanas o más. Por ejemplo, el tratamiento puede ser cada dos a cuatro semanas o cada cuatro a ocho semanas. El tratamiento se puede dar antes, y/o después de la cirugía, y/o se puede administrar o aplicar directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico o el procedimiento invasivo. Las formulaciones adecuadas y las vías de administración se describen anteriormente.

20 En algunas realizaciones, las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 como se describen en el presente documento se pueden administrar mediante inyecciones subcutáneas. Las inyecciones subcutáneas se pueden administrar utilizando un auto-inyector, por ejemplo para profilaxis/tratamiento a largo plazo.

25 En algunas realizaciones preferidas, el efecto terapéutico de la molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede persistir varias semanas, dependiendo de la dosis. Por ejemplo, el efecto terapéutico de una única dosis de la molécula de anticuerpo anti-exositio 1 puede persistir en un individuo durante 1 mes o más, 2 meses o más, 3 meses o más, 4 meses o más, 5 meses o más, o 6 meses o más. Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 descritas en el presente documento inhiben la trombina y pueden ser útiles en el tratamiento de afecciones mediadas por trombina.

30 La hemostasia es la respuesta de coagulación normal, es decir, evita el sangrado o la hemorragia, por ejemplo de un vaso sanguíneo dañado. La hemostasia detiene el sangrado y la hemorragia de los vasos sanguíneos del cuerpo.

35 Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 pueden no tener efecto o no tener efecto sustancialmente sobre la hemostasia es decir, no promueven el sangrado o la hemorragia.

40 Unos aspectos de la invención proporcionan: una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal; una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un trastorno mediado por la trombina; el uso de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección mediada por la trombina, y un método de tratamiento para una afección mediada por la trombina que comprende la administración de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento a un individuo que necesita la misma.

45 La inhibición de la trombina por anticuerpos anti-exositio 1 como se describe en el presente documento puede tener un beneficio clínico en el tratamiento de cualquier afección mediada por trombina. Una afección mediada por trombina puede incluir trastornos asociados con la formación o actividad de la trombina.

50 La trombina tiene un papel clave en la hemostasia, coagulación y trombosis. Las afecciones mediadas por trombina incluyen las afecciones trombóticas, tales como la trombosis y la embolia.

55 La trombosis es la coagulación que excede la necesaria para la hemostasia (es decir, la coagulación excesiva), o que no es necesaria para la hemostasia (es decir, coagulación extra-hemostática o no hemostática).

60 La trombosis es la coagulación sanguínea en la luz de los vasos sanguíneos. Se caracteriza por la formación de un coágulo (trombo) que excede la necesidad o que no se necesita para la hemostasia. El coágulo puede impedir el flujo sanguíneo a través de los vasos sanguíneos dando lugar a complicaciones médicas. Un coágulo puede desprenderse de su sitio de formación, dando lugar a una embolia en cualquier parte del sistema circulatorio. En el sistema arterial, la trombosis normalmente es resultado de una rotura de una placa aterosclerótica.

65 En algunas realizaciones, la trombosis puede ocurrir tras una respuesta hemostática fisiológica inicial, por ejemplo, el daño de las células endoteliales en un vaso sanguíneo. En otras realizaciones, la trombosis se puede producir en ausencia de cualquier respuesta hemostática fisiológica.

La trombosis puede producirse en individuos con una tendencia intrínseca a la trombosis (es decir, trombofilia) o en individuos 'normales' sin tendencia intrínseca a la trombosis, por ejemplo, en respuesta a un estímulo extrínseco.

5 La trombosis y la embolia pueden producirse en cualquier vena, arteria u otro vaso sanguíneo del sistema circulatorio y puede incluir la trombosis microvascular.

La trombosis y la embolia se puede asociar a la cirugía (sea durante la cirugía o después) o la inserción de objetos extraños, tales como un estent coronario, en un paciente.

10 Por ejemplo, los anticuerpos anti-exositio 1 como se describen en el presente documento pueden ser útiles en procedimientos quirúrgicos y otros en los que la sangre se expone a superficies artificiales, tales como cirugía a corazón abierto y diálisis.

15 Las afecciones trombóticas pueden incluir la trombofilia, ictus trombótico y oclusión arterial coronaria.

20 Los pacientes adecuados para el tratamiento que se describe en el presente documento incluye pacientes con afecciones en las que la trombosis es un síntoma o un efecto secundario del tratamiento o que confiere un aumento del riesgo de trombosis o pacientes que están predispuestos a un aumento del riesgo de trombosis, con respecto a la población general. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento también puede ser útil en el tratamiento o prevención de la trombosis venosa en pacientes con cáncer, y en el tratamiento o prevención de la trombosis adquirida en el hospital, que es responsable del 50 % de los casos de tromboembolia venosa.

25 Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 como se describen en el presente documento pueden ejercer un efecto terapéutico u otros beneficios en las afecciones mediadas por trombina, tales como las afecciones trombóticas, sin inhibir sustancialmente ni impedir la hemostasia. Por ejemplo, el riesgo de hemorragia en pacientes tratados con las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 puede no estar aumentado o sustancialmente aumentado con respecto a los individuos sin tratar.

30 Los individuos tratados con anticoagulantes convencionales, tales como las heparinas naturales y sintéticas, warfarina, inhibidores de la serina proteasa directos (por ejemplo, argatroban, dabigatran, apixaban, y rivaroxaban), hirudina y sus derivados (por ejemplo, lepirudina y bivalirudina), y fármacos anti-plaquetarios (por ejemplo, clopidogrel, ticlopidina y abciximab) producen sangrado. El riesgo de sangrado en los pacientes tratados con las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento puede reducirse con respecto a los individuos tratados con anticoagulantes convencionales.

35 Las afecciones mediadas por trombina incluyen afecciones no trombóticas asociadas con la actividad de la trombina, incluyendo la inflamación, infección, crecimiento tumoral y metástasis, rechazo de órganos y demencia (vascular y no vascular, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) (Licari et al J Vet Emerg Crit Care (San Antonio). 2009 Feb; 19(1):11-22; Tsopanoglou et al Eur Cytokine Netw. 2009 Dic 1; 20(4):171-9).

40 Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 como se describen en el presente documento también pueden ser útiles en ensayos in vitro, por ejemplo, en el análisis y caracterización de la coagulación, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente.

45 Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 pueden ser útiles en la medición de la generación de trombina. Los ensayos de generación de trombina son técnicamente problemáticos debido a la conversión de fibrinógeno a fibrina que produce turbidez, que excluye el uso de un simple criterio de valoración cromogénico.

50 La adición de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento a una muestra de sangre evita o inhibe la formación de fibrina y por lo tanto la turbidez y permite que se mida la generación de trombina utilizando un sustrato criogénico sin la necesidad de una etapa de desfibrinación.

55 Por ejemplo, un método de medición de la generación de trombina puede comprender poner en contacto una muestra de sangre con un sustrato de trombina cromogénico en presencia de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento y la medición de la señal cromogénica del sustrato;

donde la señal cromogénica es indicativa de la generación de trombina en la muestra

60 La señal cromogénica se puede medir directamente sin desfibrinación de la muestra.

Los sustratos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNa), diacetato de β -Ala-Gly-Arg-p-nitroanilida (Prasa, D. et al. (1997) Thromb. Haemost. 78, 1215; Sigma Aldrich Inc) y Tos-Gly-Pro-Arg-pNa.AcOH (Biophen CS-01(81); Aniara Inc OH USA).

65

Las moléculas de anticuerpo anti-exositio 1 también pueden ser útiles en la inhibición o para evitar la coagulación de la sangre como se ha descrito anteriormente en la circulación extracorpórea, tal como hemodiálisis y la oxigenación por membrana extracorpórea.

5 Por ejemplo, un método de inhibición o para evitar la coagulación de la sangre in vitro o ex vivo puede comprender la introducción de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento en una muestra de sangre. La muestra de sangre se puede introducir en un sistema de circulación extracorpórea antes, simultáneamente o tras la introducción del anticuerpo anti-exositio 1 y opcionalmente someterse a un tratamiento tal como la hemodiálisis o la oxigenación. En algunas realizaciones, la sangre tratada puede administrarse
10 posteriormente a un individuo. Otras realizaciones proporcionan molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento para su uso en un método de inhibición o para evitar la coagulación sanguínea en una muestra de sangre ex vivo y el uso de una molécula de anticuerpo anti-exositio 1 como se describe en el presente documento para su uso en un método de inhibición o para evitar la coagulación sanguínea en una muestra de sangre ex vivo.

15 Otros aspectos de la invención se refieren a la producción de moléculas de anticuerpo que se unen a un epítipo exositio 1 de la trombina y puede ser útil, por ejemplo, en el tratamiento de la coagulación sanguínea patológica o trombosis.

20 Un método para producir un dominio de unión al antígeno del anticuerpo para el epítipo exositio 1 de la trombina, puede comprender:

proporcionar, mediante la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de un dominio VH parental que comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3, donde la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5 respectivamente, un dominio VH que es una variante de secuencia de aminoácidos del dominio VH parental; y
25 combinar opcionalmente el dominio VH proporcionado de esta manera con uno o más dominios VL para proporcionar una o más combinaciones VH/VL; y
ensayar dicho dominio VH que es una variante de secuencia de aminoácidos del dominio VH parental o la combinación o combinaciones VH/VL para identificar un dominio de unión al antígeno del anticuerpo para el epítipo exositio 1 de la trombina.
30

Un dominio VH que es una variante de secuencia de aminoácidos del dominio VH parental puede tener la secuencia HCDR3 de la SEQ ID NO: 5 o una variante con adición, eliminación, sustitución o inserción de uno, dos, tres o más aminoácidos.
35

el dominio VH que es una variante de secuencia de aminoácidos del dominio VH parental puede tener las secuencias HCDR1 y HCDR2 de las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, o variantes de esas secuencias con la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno, dos, tres o más aminoácidos.
40

Un método para producir una molécula de anticuerpo que se une específicamente al epítipo exositio 1 de la trombina puede comprender:

proporcionar un ácido nucleico de partida que codifica un dominio VH o un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican cada uno un dominio VH, donde el dominio VH o los dominios VH comprenden una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 que se va a reemplazar o que carecen de una región codificante de HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3;
45 combinar dicho ácido nucleico de partida o repertorio de partida con un ácido nucleico donante o ácidos nucleicos donantes que codifican o se producen por mutación de la secuencia de aminoácidos de una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, de manera que dicho ácido nucleico donante o ácidos nucleicos donantes están insertadas en la región de la CDR1, CDR2 y/o CDR3 del ácido nucleico de partida o repertorio de partida, para proporcionar un producto que es un repertorio de ácidos nucleicos que codifican los dominios VH;
50 expresar los ácidos nucleicos de dicho producto que es un repertorio para producir un producto de dominios VH;
combinar opcionalmente dicho producto de dominios VH con uno o más dominios VL;
seleccionar una molécula de anticuerpo que se une al exositio 1 de la trombina, cuya molécula de anticuerpo comprende un producto que es un dominio VH y opcionalmente un dominio VL; y
55 recuperar dicha molécula de anticuerpo o ácido nucleico que la codifica.

60 Las técnicas adecuadas para la maduración y optimización de moléculas de anticuerpo se conocen bien en la técnica.

Los dominios de unión al antígeno del anticuerpo y las moléculas de anticuerpo para el epítipo exositio 1 de la trombina se pueden ensayar como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, se puede determinar la capacidad de unión a la trombina y/o la inhibición de la escisión de sustratos de trombina.
65

El efecto de una molécula de anticuerpo sobre la coagulación y el sangrado se puede determinar utilizando técnicas convencionales. por ejemplo, se puede emplear un modelo de trombosis en ratón o la inducción de un coágulo de cloruro férrico en un vaso sanguíneo, tal como la vena femoral o la arteria carótida, seguido por un sangrado de la cola para ensayar la hemostasia normal.

5 Distintos aspectos adicionales y realizaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

10 Todos los documentos mencionados en la presente memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

A menos de que se establezca otra cosa, los restos de anticuerpo se numeran en el presente documento de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.

15 Cuando se utiliza "y/o" en el presente documento se tiene que tomar como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" se tiene que tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

20 A menos de que el contexto dicte otra cosa, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención y se aplica igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se han descrito. Por lo tanto, las características expuestas anteriormente se desvelan en todas las combinaciones y permutaciones.

25 Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán a hora mediante ejemplos y en referencia a las figuras y tablas que se describen posteriormente.

30 La Figura 1 muestra la unión y la elución de la IgA en una columna Sepharose-trombina humana. La Figura 1A muestra un perfil de elución por IgA (pico estrecho) a partir de una columna de Sepharose-trombina utilizando un gradiente de pH (neutro a bajo, indicado por la línea con pendiente hacia arriba). La Figura 1B muestra un gel azul nativo que muestra la carga total de IgA, el flujo continuo a partir de la columna de trombina humana y el eluido tras la elución a pH bajo.

35 La Figura 2 muestra un gel de SDS-PAGE no reductor que indica que la IgA se une a la trombina pero no a la protrombina. En este ensayo de purificación por afinidad tipo pull-down, se utiliza lectina de agarosa para unirse a la IgA en presencia de trombina o protrombina. El sobrenadante se pasa entonces en un gel SDS. La calle 1 son las referencias de tamaño; la calle 2 muestra un agotamiento de trombina en el sobrenadante; la calle 3 muestra que el agotamiento depende de la presencia de IgA; las calles 3 y 4 muestran que la protrombina no se agota, y por lo tanto no se une a la IgA.

40 La Figura 3 muestra la tasa de escisión de S2238 por la trombina en presencia o ausencia de IgA (es decir, una pendiente única de Abs405 con tiempo para la hidrólisis de S2238). Esto indica que la IgA no se une en el sitio activo de la trombina.

45 La Figura 4 muestra los resultados de los estudios de unión que indican que la IgA compite con el dodecapéptido hirugen marcado fluorescentemente por la unión a la trombina.

50 La Figura 5 muestra el efecto de la IgA sobre la escisión de S2238 por la trombina. Este análisis permite estimar la Kd de la interacción IgA-trombina se 12 nM.

La Figura 6 muestra un gel SDS-PAGE de IgA completa y fragmentos Fab en condiciones reductoras y no reductoras (ox). La IgA no reducida muestra que tiene un peso molecular de 100-200 kDa y el Fab no reducido tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa.

55 La Figura 7 muestra la estructura cristalina del complejo trombina-Fab que muestra la interacción entre el exosito 1 de la trombina y la HCDR3 del fragmento Fab.

60 La Figura 8 muestra en detalle la estructura cristalina que muestra la interacción entre restos específicos del exosito de trombina y la HCDR3 del fragmento Fab.

La Figura 9 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de los coágulos sanguíneos inducidos por el FeCl₃ en daños de la vena femoral en ratones C57BL/6 inyectados con fibrinógeno marcado con FITC tomadas entre los 2 y 30 minutos. Se administraron 100 ul de PBS (vehículo de control).

65 La Figura 10 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de coágulos sanguíneos inducidos por el FeCl₃ en lesiones de la vena femoral en ratones C57BL/6 inyectados con fibrinógeno marcado con FITC y 40 nM

(concentración final en la sangre del ratón, equivalente a una dosis de aproximadamente 0,6 mg/kg) de IgA anti-exosito 1 (100 µl en PBS).

5 La Figura 11 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de coágulos sanguíneos inducidos por el FeCl₃ en lesiones de la vena femoral en ratones C57BL/6 inyectados con fibrinógeno marcado con FITC y 80 nM (concentración final en la sangre del ratón, equivalente a una dosis de aproximadamente 1,2 mg/kg) de IgA anti-exosito 1 (100 µl en PBS), y una región fuera del sitio de la lesión para la comparación.

10 La Figura 12 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de coágulos sanguíneos inducidos por el FeCl₃ en lesiones de la vena femoral en ratones C57BL/6 inyectados con fibrinógeno marcado con FITC y 200 nM (concentración final en la sangre del ratón, equivalente a una dosis de aproximadamente 3 mg/kg) de IgA anti-exosito 1 (100 µl en PBS), y una región fuera del sitio de la lesión para la comparación.

15 La Figura 13 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de coágulos sanguíneos inducidos por el FeCl₃ en lesiones de la vena femoral en ratones C57BL/6 inyectados con fibrinógeno marcado con FITC y 400 nM (concentración final en la sangre del ratón, equivalente a una dosis de aproximadamente 6 mg/kg) de IgA anti-exosito 1 (100 µl en PBS).

20 La Figura 14 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de coágulos sanguíneos inducidos por el FeCl₃ en lesiones de la vena femoral en ratones C57BL/6 inyectados con fibrinógeno marcado con FITC y 4 µM (concentración final en la sangre del ratón, equivalente a una dosis de aproximadamente 60 mg/kg) de IgA anti-exosito 1 (100 µl en PBS).

25 La Figura 15 muestra una cuantificación de la respuesta a la dosis frente a la IgA anti-exosito 1 a partir de imágenes fluorescentes que se muestran en las Figuras 9 a 13.

La Figura 16 muestra los tiempos de sangrado por la cola en ratones C57BL/6 de control tratados con cantidades crecientes de IgA anti-exosito 1. La segunda media excluye los casos atípicos.

30 La Figura 17 muestra los resultados de los ensayos de corte de rabo en machos de tipo silvestre de ratones C57BL/6 (n = 5) tras la inyección en la vena caudal con IgA o PBS. Se cortaron los rabos 15 min después de la inyección en un diámetro de 3 mm y se controló la pérdida de sangre durante 10 min.

35 La Figura 18A a 18D muestra los resultados de un modelo de oclusión de la arteria carótida con FeCl₃ en ratones macho C57BL/6 TS de 9 semanas de edad inyectados como anteriormente con 400 nM de IgA anti-trombina (concentración final en la sangre, equivalentes a una dosis de aproximadamente 6 mg/kg) o PBS 15 minutos antes de la lesión con un 5 % de FeCl₃ durante 2 min. La Figura 18A muestra los resultados de un ratón inyectado con PBS típico (oclusión en 20 min) y las figuras 18B, 18C y 18D muestra ejemplos de resultados para los ratones tratados con 400 nM de IgA anti-trombina (no hay oclusión).

40 La Figura 19 muestra los tiempos de trombina (es decir, la coagulación de plasma agrupado) con concentraciones crecientes de IgG e IgA de la invención, al añadir 20 nM de trombina humana.

45 La Figura 20 muestra la unión de la IgG sintética a la trombina inmovilizada (en un instrumento ForteBio Octet Red).

La Figura 21 muestra una representación Octet típica de la unión de 24 nM de trombina S195A a la IgG inmovilizada que muestra la fase activada, seguida por una fase inactivada. La línea negra es el ajuste.

50 La Figura 22 muestra una representación Octet de 500 nM de protrombina con una punta cargada con IgG inmovilizada. Se utilizaron las mismas condiciones como el experimento con trombina de la Fig. 21. No hay evidencia de unión, incluso a esta alta concentración.

55 Experimentos

1. Aislamiento y caracterización de anticuerpos

60 La exploración de la coagulación se llevó a cabo en una muestra de plasma sanguíneo de un paciente. Los ensayos de coagulación se llevaron a cabo en un paciente que padecía un hematoma subdural después de una lesión en la cabeza. El hematoma se resolvió espontáneamente sin intervención. No había una historia previa de sangrado en los 4 años desde que se presentó el paciente, no había habido episodios de sangrado adicionales. Los resultados se mostraron en la Tabla 1.

65 El tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y tiempo de trombina (TT) se prolongaron en el paciente en comparación con los controles, pero el tiempo de reptilasa era normal.

El tiempo de trombina o se corregía con heparinasa, indicando que el tratamiento con heparina o la contaminación no era responsable. los niveles de fibrinógeno eran normales en el paciente, según el ELISA y los ensayos con Reptilasa. El ensayo de Clauss daba un nivel de fibrinógeno bajo artificialmente debido a la presencia del inhibidor de trombina. Se descubrió que los tiempos de coagulación PT y APTT se mantenían prolongados tras un ensayo mixto utilizando una mezcla 50:50 con plasma agrupado de individuos normales. Esto demostraba la presencia de un inhibidor en la muestra del paciente.

Se descubrió que el plasma sanguíneo del paciente tenía un alto título de una IgA. Se descubrió que esta molécula de IgA se unía a una columna de trombina humana (Figura 1). La unión de IgA a lectina de agarosa purificaba por afinidad tipo pull down la trombina en presencia pero no en ausencia de la IgA. La protrombina no se purificaba por afinidad tipo pull down por la lectina de agarosa en presencia de IgA, indicando que la IgA se une específicamente a la trombina pero no a la protrombina (Figura 2).

El sitio de unión de la IgA sobre la molécula de trombina se investigó entonces.

Se midió una tasa ligeramente mayor de escisión de S2238 por la trombina en presencia de IgA, indicando que la IgA no bloquea el sitio activo de la trombina (Figura 3).

La unión de hirugen marcado fluorescentemente a la trombina se inhibe por la presencia de 700 nM de la IgA, indicando que el epítipo para el anticuerpo se solapa con el sitio de unión del hirugen a la trombina, a saber el exosito 1 de la trombina.

Se ensayó el efecto de la IgA en la hidrólisis de algunos sustratos procoagulantes de trombina. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Estos resultados demuestran que la molécula de IgA aislada a partir de la muestra del paciente inhibe múltiples actividades procoagulantes de la trombina.

La inhibición de la trombina por la antitrombina (AT) en presencia de IgA estaba afectada solo marginalmente tanto en ausencia como en presencia de heparina (Tabla 3).

La constante de disociación (Kd) de la IgA para la trombina se estimó inicialmente basándose en la tasa de hidrólisis de S2238 que era de 12 nM (Figura 5). La Kd para la unión de la IgA a la trombina S195A (inactivada por mutación de la serina catalítica) se determinó que era de 2 nM utilizando el instrumento ForteBio Octet Red (Tabla 4).

La IgA purificada se escindió con papaína (Figura 6), y se aisló el fragmento Fab y se combinó con el PPACK-Trombina humana (PPACK es un inhibidor del sitio activo covalente). Se cristalizó el complejo PPACK-Trombina humana-FAB y se utilizó para el análisis estructural. Las estadísticas de la estructura obtenidas eran las siguientes: resolución de 1,9 Å; factorR= 19,43 %; Rlibre = 23,42 %; un complejo en la unidad asimétrica; Ramachandran: favorecido = 97,0 %, valores atípicos = 0 %. La estructura cristalina revelaba una estrecha asociación entre la HCDR3 del Fab de IgA y el exosito 1 de la trombina (Figura 7).

En particular, los restos M32, F34, Q38, E39, L40, L65, R67, R73, T74, R75, Y76, R77a y I82 del exosito 1 interactúan directamente con el bucle de la HCDR3 del Fab de IgA (Figura 8).

El análisis PISA de la interfaz anticuerpo-trombina mostraba que la superficie del área no expuesta total en el complejo es de 1075 Å². Los restos de contacto en la cadena pesada de la IgA eran (numeración de Kabat): 30, 51, 52a, 53-55, 96, 98, 99, 100, 100a, 100b, 100c, 100d). Todos están en las CDR: HCDR1- GYTLTEAAIH; HCDR2- GLDPQDGETVYAQQFKG; HCDR3- GDFSEFEPFSMDYFHF (restos en contacto subrayados). Se descubrió que la HCDR3 era la más importante, proporcionando el 85 % del área de superficie no expuesta del anticuerpo. La cadena ligera produce un contacto marginal con Tyr 49, justo antes de la LCDR2 (con la Ser 36a de la trombina). Algunas contribuciones de la superficie no expuesta eran: Glu 99 54 Å², Phe 100 134,8 Å², Glu 100a 80,6 Å², Phe 100c 141,7 Å².

Se descubrió que los restos de la trombina en contacto eran (numeración de quimotripsina): 32, 34, 36a-40, 65, 67, 73-76, 77a, 82, y 151. Los contribuyentes individuales más importantes de la superficie no expuesta eran: Gln 38 86,4 Å², Arg 73 44,5 Å², Thr 74 60,1 Å², Tyr 76 78,4 Å², Arg 77a 86,9 Å².

El paciente no presentaba un sangrado o hemorragia anormales o aumentados, a pesar de los niveles circulantes de 3 g/l de esta IgA, demostrando que el anticuerpo inhibe la trombina sin afectar la hemostasia normal.

2. Efecto de la IgA en modelos animales de trombosis

Los ratones C57BL/6 se anestesiaron. Se insertó un catéter en la arteria carótida (para la inyección de compuestos). Se inyectó fibrinógeno marcado con FITC (2 mg/ml) por la arteria carótida. También se inyectó PBS (control) o IgA por la arteria carótida. Se expuso la vena femoral y se aplicó FeCl₃ al 10 % (en papel de transferencia saturado de 3 mm de longitud) durante 3 minutos para inducir la coagulación.

Se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia a lo largo de la longitud del sitio de la lesión a 0, 5, 10 y 20 min tras la lesión con FeCl₃ utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia.

5 Los coágulos (depósitos de fibrina) en la vena femoral eran claramente visibles como áreas brillantes (Figura 9). Se observó que la dosis menor de anticuerpo producía una inhibición significativa de la coagulación, pero según se aumentaba la dosis, la coagulación se abolía (Figuras 10 a 15).

10 También se midieron los tiempos de sangrado de los ratones. Los tiempos de sangrado se evaluaron en el momento del cese de flujo sanguíneo tras un corte en la cola. A pesar de la presencia de una única muestra de valores atípicos, se descubrió que el tiempo de sangrado no estaba afectado por el tratamiento con la IgA anti-exosito 1 (Figura 16).

15 Estos resultados muestran que el anticuerpo IgA anti-exosito 1 es un potente inhibidor de la trombosis pero que no tiene efecto sobre el tiempo de sangrado.

3. Ensayos de corte de cola

20 Se llevó a cabo ensayos de corte de cola en machos de ratones C57BL/6 tipo silvestre inyectados con 400 nM de IgA (concentración sanguínea final, equivalente a una dosis de aproximadamente 6 mg/kg) o PBS. Se controló la pérdida de sangre durante 10 min después de que se cortara la cola a 3 mm de diámetro 15 minutos después de la inyección. Se descubrió que la pérdida de sangre total no estaba afectada por el tratamiento con una IgA anti-exosito 1 (Figura 17).

4. Oclusión de la arteria carótida por la lesión por FeCl₃

25 Se llevaron a cabo la oclusión de la arteria carótida por una lesión con FeCl₃ en ratones macho C57BL/6 TS de 9 semanas de edad. Se inyectó a los ratones 400 nM de IgA anti-IIa (concentración final en la sangre, equivalente a una dosis de aproximadamente 6 mg/kg) o PBS 15 min antes de la lesión con FeCl₃ al 5 % durante 2 min. Se controló entonces el flujo sanguíneo por Doppler y se midió el tiempo de oclusión. Se definió un "coágulo" como el trombo oclusivo estable donde el flujo sanguíneo se reducía a valores normalmente menores de 0,1 ml/min y permanecía reducido. En los ratones de control, se observaba un coágulo estable que se formaba aproximadamente a los 20 min tras la lesión (Figura 18A). Sin embargo, la mayoría de los ratones tratados con 400 nM de IgA anti-IIa eran incapaces de formar coágulos estables y daban trazos en los que los coágulos se resolvían rápidamente, se resolvían repetidamente o nunca se formaban. Se muestran tres trazos representativos en las Figuras 18B a 18D.

5. IgG anti-exosito 1

40 La molécula de IgA identificada en el paciente descrito anteriormente se re-formató a IgG utilizando técnicas convencionales.

45 El tiempo de coagulación del plasma humano agrupado vertido con cantidades crecientes de la IgA original y se ensayó la nueva IgG al añadirse trombina humana a 20 nM (Figura 19). Tanto la IgA parental como la IgG sintética aumentaban el tiempo de formación del coágulo de una manera dependiente de la concentración idéntica, implicando afinidades idénticas para la protrombina.

50 Esto se confirmó midiendo la unión de la IgG sintética a trombina S195A inmovilizada utilizando un instrumento ForteBio™ Octet Red. Se unió la trombina a una sonda y se controló la unión de los anticuerpos (a distintas concentraciones). Se determinaron las tasas de activación e inactivación. Ambos anticuerpos daban tasas de activación similares de aproximadamente $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y tasas de inactivación de aproximadamente $5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, y constantes de disociación (Kd) de aproximadamente 2 nM. También se obtuvieron tasas de aproximadamente 2 nM para la IgA y la IgG por el análisis de estado estacionario (Tabla 4). Se muestra una curva representativa del estado estacionario en la Figura 20. Las propiedades de la IgA por lo tanto se reprodujeron en un armazón de IgG.

55 La unión de la protrombina al anticuerpo IgG se ensayó utilizando el sistema Octet inmovilizando la IgG. La trombina unida a la IgG inmovilizada con tasas y afinidades comparables a las obtenidas utilizando la trombina (Tabla 4); la protrombina no se unía a la IgG. La Figura 21 es una representación de 24 nM de trombina unida y disociada de la IgG inmovilizada. La Figura 22 es el mismo experimento utilizando 500 nM de protrombina, y no muestra evidencias de unión.

60 Secuencias

65 Secuencia de aminoácidos de la preprotrombina humana (SEQ ID NO: 1; GeneID: 2147, NP_000497.1 GI: 4503635; los restos del exosito 1 están subrayados).

ES 2 642 718 T3

```

1 mahvrglqlp gclalaaals lvhsqhvfla pqqarsllqr vrrantflee vrkgnlerec
61 veetcsyeea fealesstat dvfwakytac etartprdkl aaclegnae glgtnyrghv
121 nitrsgiecq lwrsryphkp einstthpga dlqenfcrrp dssttgpwcy ttdptvrrqe
181 csipvcgqdq vtvamtprse gssvnlsppl eqcvpdrqqq yqgrlavtth glpclawasa
241 qakalskhqd fnsavqlven fcrnpdgree gwvcyvagkp gdfgycdlny ceeaveeetg
301 dgldedsdra iegrtatsey qtffnprtfg sgeadcglrp lfekksledk terellesyi
361 dgrivegsda eigmspwqvm lfrkspgell cgaslisdrw vltaahclly ppwdknften
421 dllvrigkhs rtryerniek ismlekiyih prynwrenld rdialmklkk pvafsdvihp
481 vclpdretaa sllqagykr vtgwnlket wtanvgkqqp svlqvvnlpi verpvckdst
541 riritdnmfc agykpdegkr gdacegdsgg pfvmkspfnn rwyqmgivsw gegcdrdgky
601 gfythvfrlk kwiqkvidqf ge

```

Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y el dominio VH de IgG con la numeración de Kabat (las CDR están subrayadas): (SEQ ID NO: 2).

5

QVQLIQSGSAVKKPGASVRVSVCKVSGYTLTEAAIHWVRQAPGKGLEWMGG
 10 20 30 40 50

LDPQDGETVYAAQQFKGRVTMTEDRSTDTAYMEVNNLRSEDTATYYCTTGD
52a 60 70 8082abc 90

FSEFEPFSMDYFHFHWGQGTVVTVAS
100abcdefgh 110

Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y HCDR1 de IgG (SEQ ID NO: 3).

GYTLTEAAIH

10 Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y HCDR2 de IgG (SEQ ID NO: 4).

GLDPQDGETVYAAQQFKG

Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y HCDR3 de IgG (SEQ ID NO: 5).

GDFSEFEPFSMDYFHF

15 Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y el dominio VL de IgG con la numeración de Kabat: (SEQ ID NO: 6).

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNVSSFLAWYQHKPGQAPRLLIYD
 10 20 30 40 50

ASSRATDIPIRFSGSGGTDFLTISGLEPEDFAVYYCQRRSWPPLTFG
 60 70 80 90 95a

GGTKVEIKR
100 108

20 Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y LCDR1 de IgG (SEQ ID NO: 7).

RASQNVSSFLA

Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y LCDR2 de IgG (SEQ ID NO: 8).

DASSRAT

Secuencia de aminoácidos de la IgA anti-exosito 1 y LCDR3 de IgG (SEQ ID NO: 9).

25 QRRSWPPLT

Tabla 1 – Resultados de la exploración de la coagulación

Ensayo		Resultado	Relación Control/Normalizado (NR)
Tiempo de protrombina		43 s	NR = 11-13 s
	50:50 corrección	35 s	
Tiempo de tromboplastina parc. act.		157 s	NR = 22-23 s
	50:50 corrección	105 s	
Tiempo de protrombina		>150 s	NR = 10-13 s
Tiempo de Reptilasa		16 s	Control = 15 s
Fibrinógeno	Clauss	0,7 g/l	NR = 1,5-4,5 g/l
	Antigénico	5,0 g/l	

Tabla 2. Efecto de la IgA anti-exosito 1 sobre la hidrólisis por la trombina de los sustratos procoagulantes

Sustrato de trombina	Actividad	Efecto del anticuerpo
Fibrinógeno	Formación del coágulo de fibrina	Escisión no detectable
Péptido receptor de plaquetas PAR-1	Activación de plaquetas	Disminución de 15 veces de la hidrólisis
FVIII	Activación retroalimentada de la trombina mediante el complejo Xasa	Disminución de 7 veces de la hidrólisis

5 Tabla 3. Efecto de la concentración de saturación de IgA anti-exosito 1 (Fab) sobre la inhibición de la trombina por la antitrombina (AT) en ausencia o presencia de 1 nM de heparina (Hep)

	Tasa de inhibición ($M^{-1} s^{-1}$)	Efecto de heparina
AT	$4,8 \pm 0,2 \times 10^3$	2,4 veces
AT+Hep	$11,8 \pm 0,3 \times 10^3$	
AT+Fab	$1,7 \pm 0,1 \times 10^3$	3,3 veces
AT+Hep+Fab	$5,6 \pm 0,3 \times 10^3$	

10 Tabla 4. Constantes de unión de la IgA anti-exosito 1 ($n = 1$ en esta condición precisa), anticuerpos IgG ($n = 3$), y FAB derivado de IgG para la trombina S195A (sitio activo libre, trombina recombinante). *Kd determinada por el análisis de estado estático de la respuesta frente a la concentración. # Kd calculada a partir de las tasas. +

Determinada utilizando FAB inmovilizado

	Kd (nM)*	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	Kd (nM)#
IgA	1,8	$3,3 \times 10^5$	$3,7 \times 10^{-4}$	1,2
IgG	$1,5 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,5 \times 10^5$	$6,8 \pm 1,1 \times 10^{-4}$	$2,1 \pm 0,3$
IgG FAB	ND	$5,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-3}$	5,3
IgG FAB ⁺	$3,3 \pm 0,3$	$4,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{-3}$	4,9

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de anticuerpo aislada que se une específicamente en la región del exosito 1 de la trombina, donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH que comprende unas HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y un dominio VL que comprende unas LCDR2 y LCDR3 que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente, y una LCDR1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 7 o una LCDR1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 7 en la que el sitio de glicosilación está mutado por la introducción de una sustitución de un resto de aminoácido que se corresponde con la S30 de la SEQ ID NO: 6.
- 10 2. La molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que inhibe la actividad de la trombina.
3. La molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 15 4. La molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en la que un sitio de glicosilación está mutado introduciendo una sustitución en un resto de aminoácido que se corresponde con la S30.
- 20 5. La molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es un anticuerpo completo.
6. La molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que es una IgA o IgG.
- 25 7. La molécula de anticuerpos de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es un anticuerpo monoclonal.
8. La molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es un fragmento de anticuerpo.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.
- 35 11. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de tratamiento de una afección mediada por la trombina que se selecciona de entre trombosis y embolia.

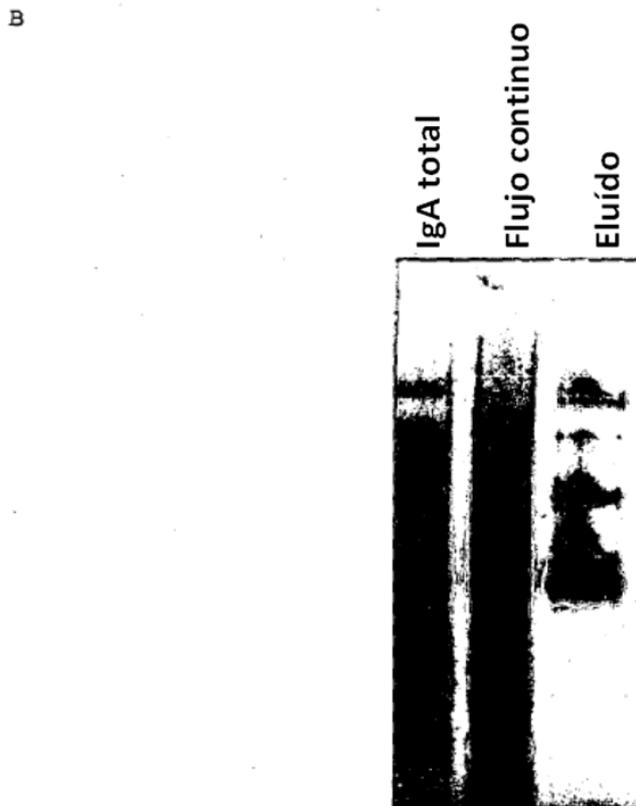
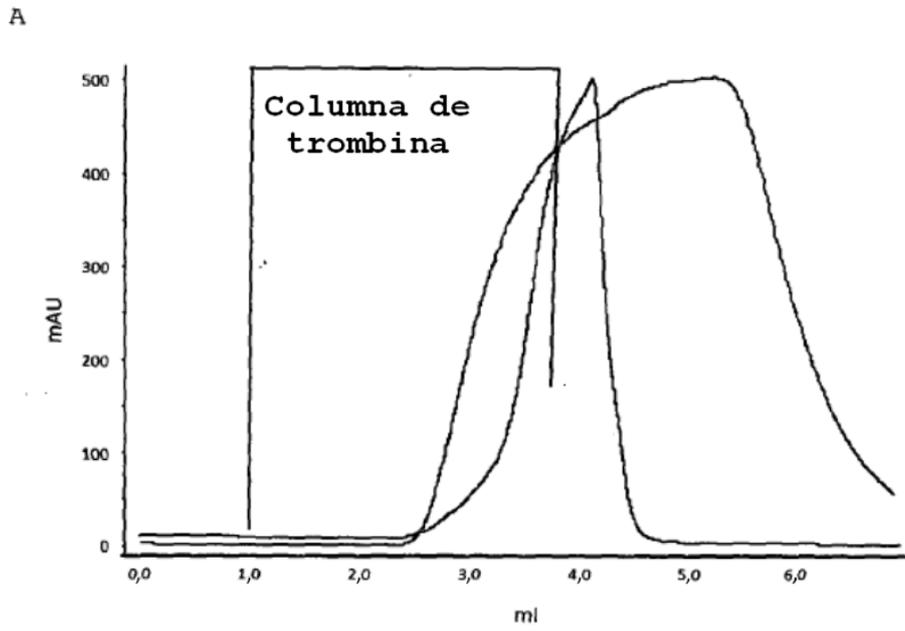


Figura 1

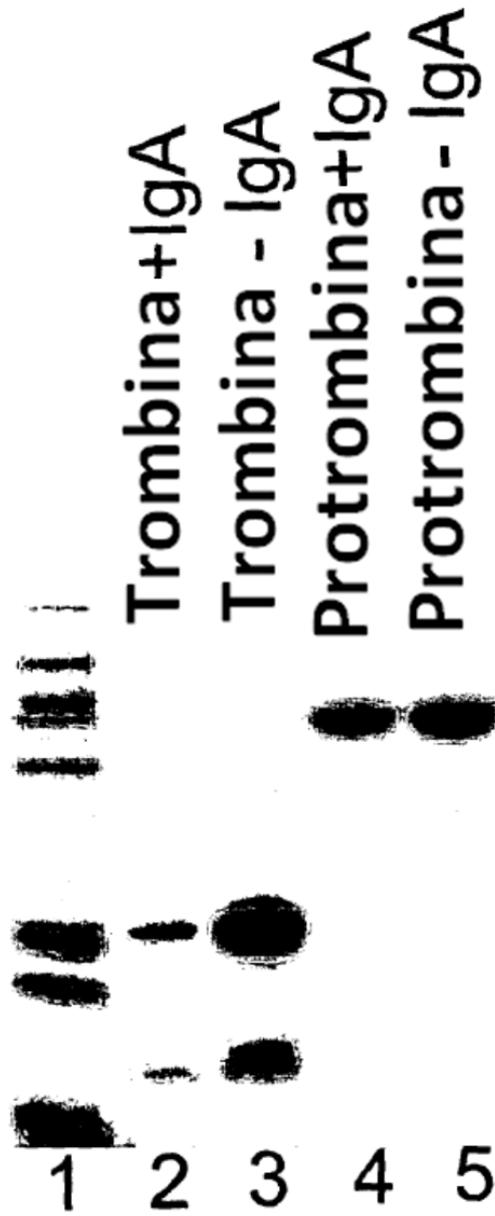


Figura 2

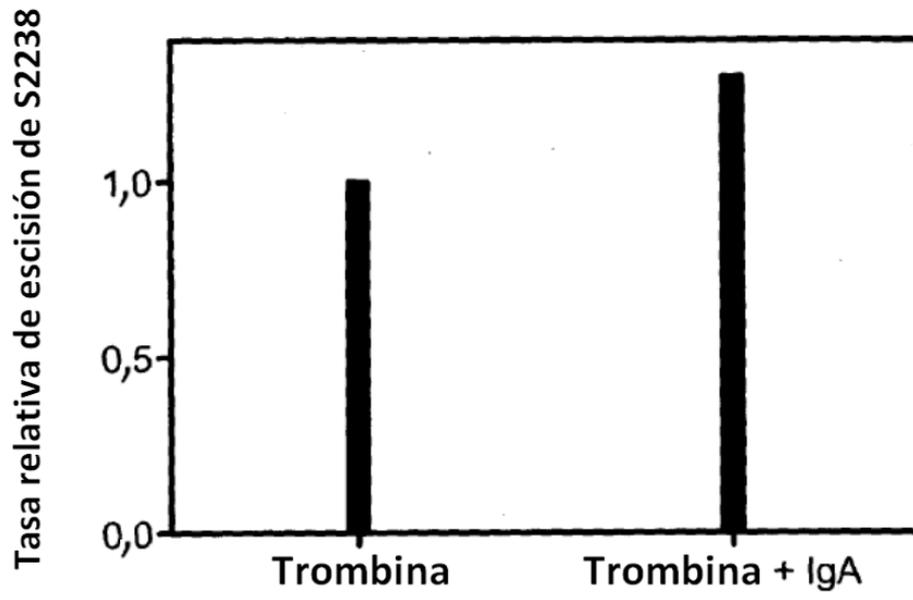


Figura 3

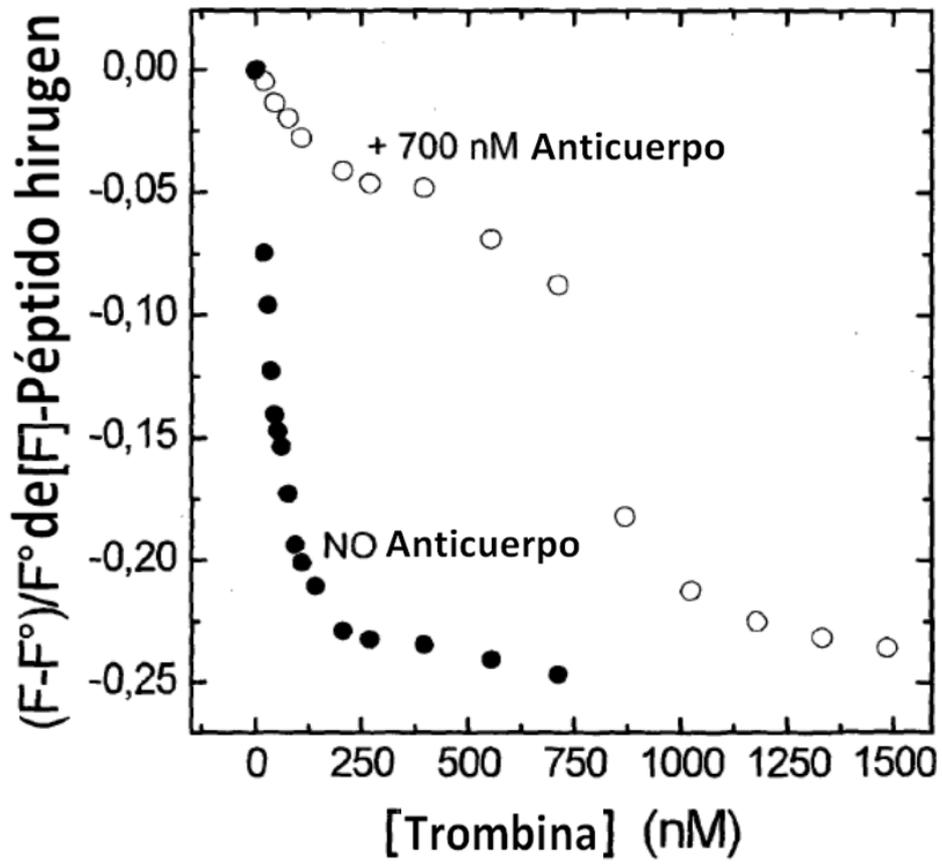


Figura 4

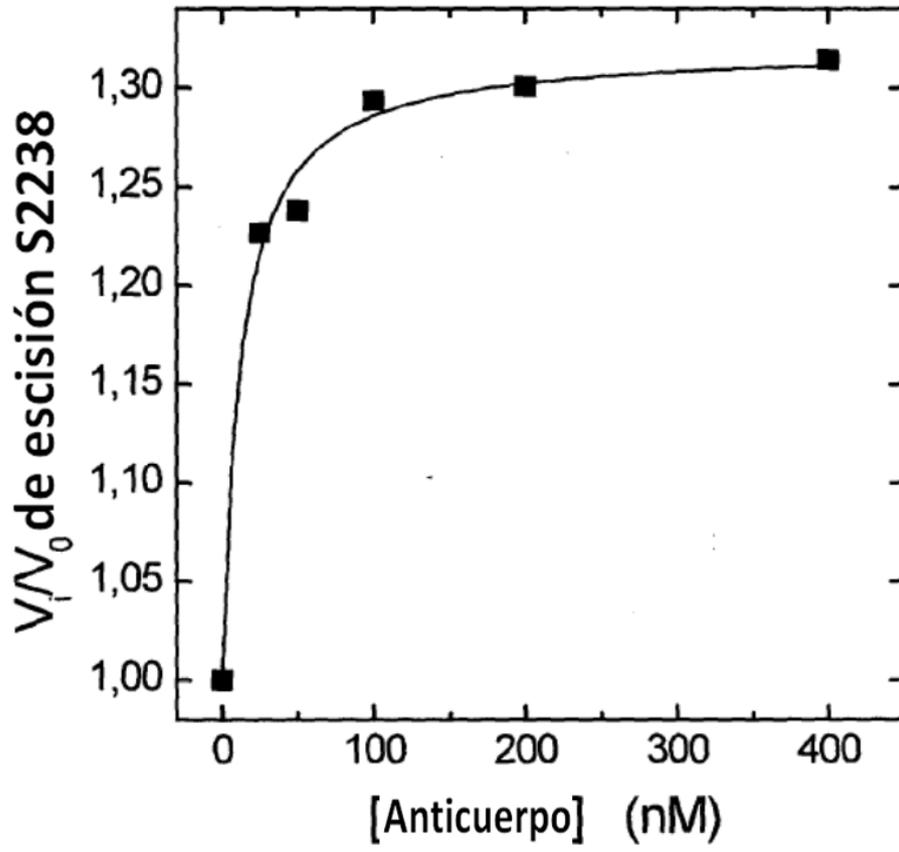


Figura 5

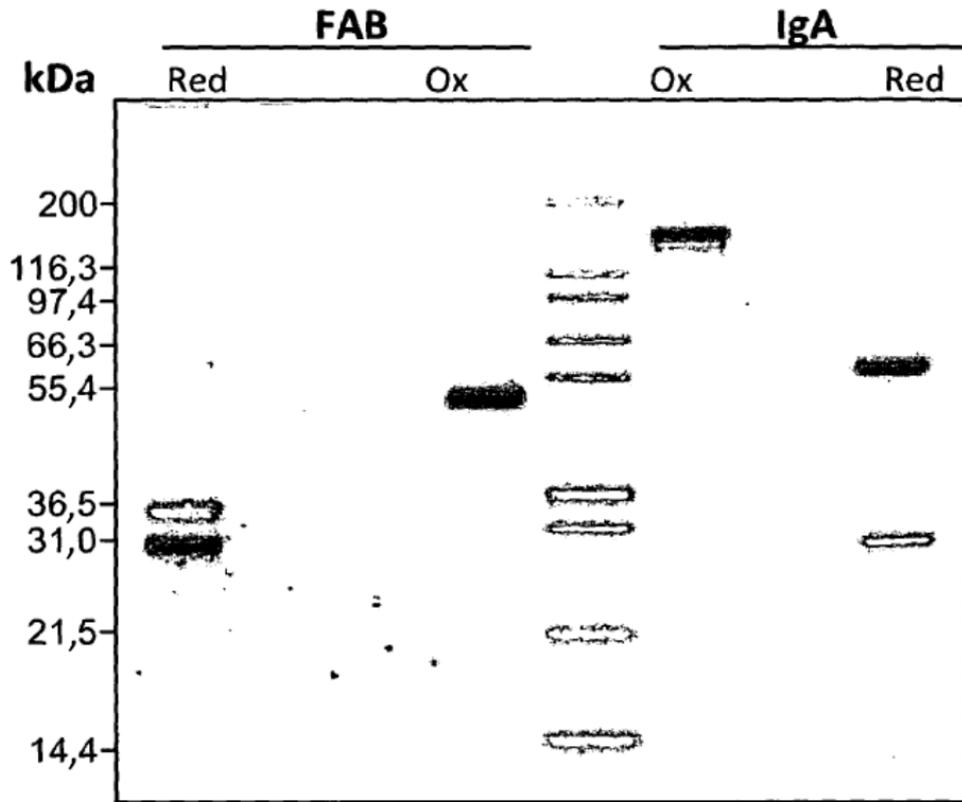


Figura 6

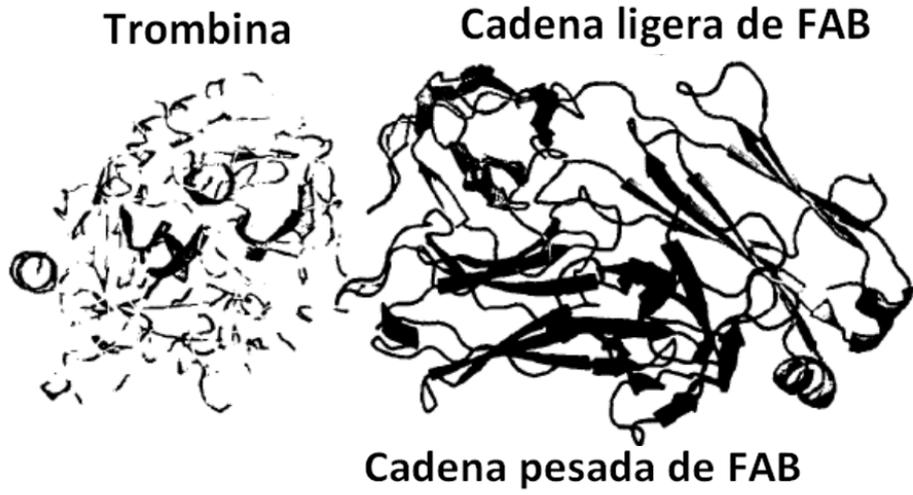


Figura 7

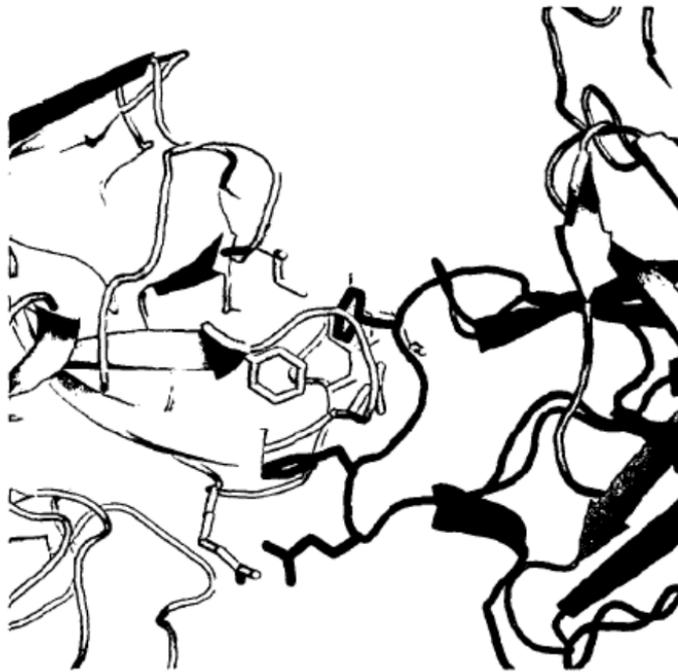


Figura 8

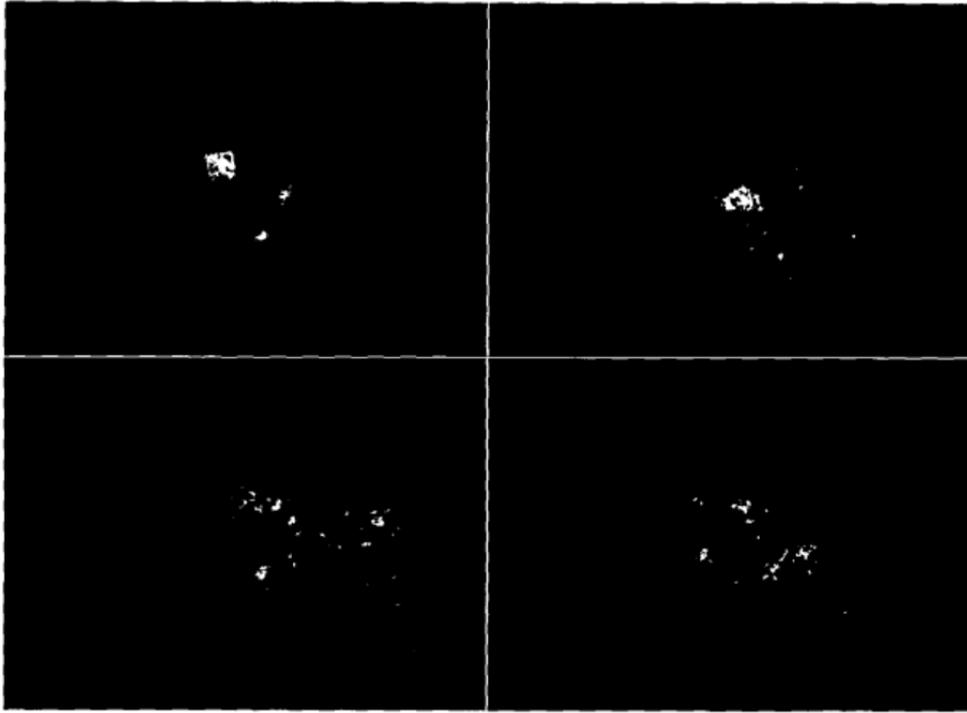


Figura 9

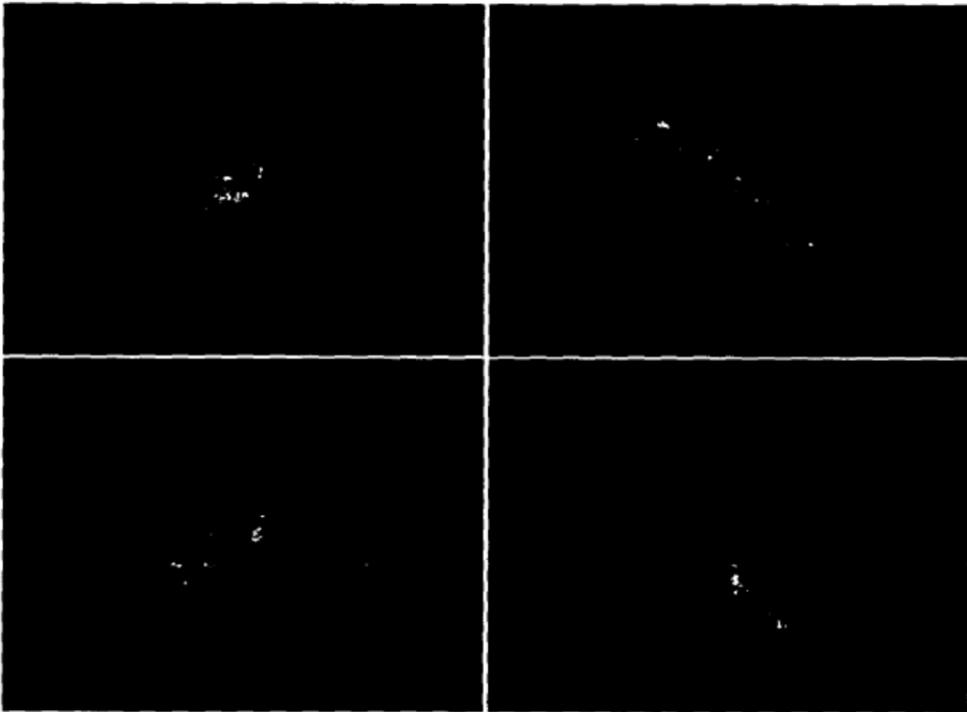


Figura 10

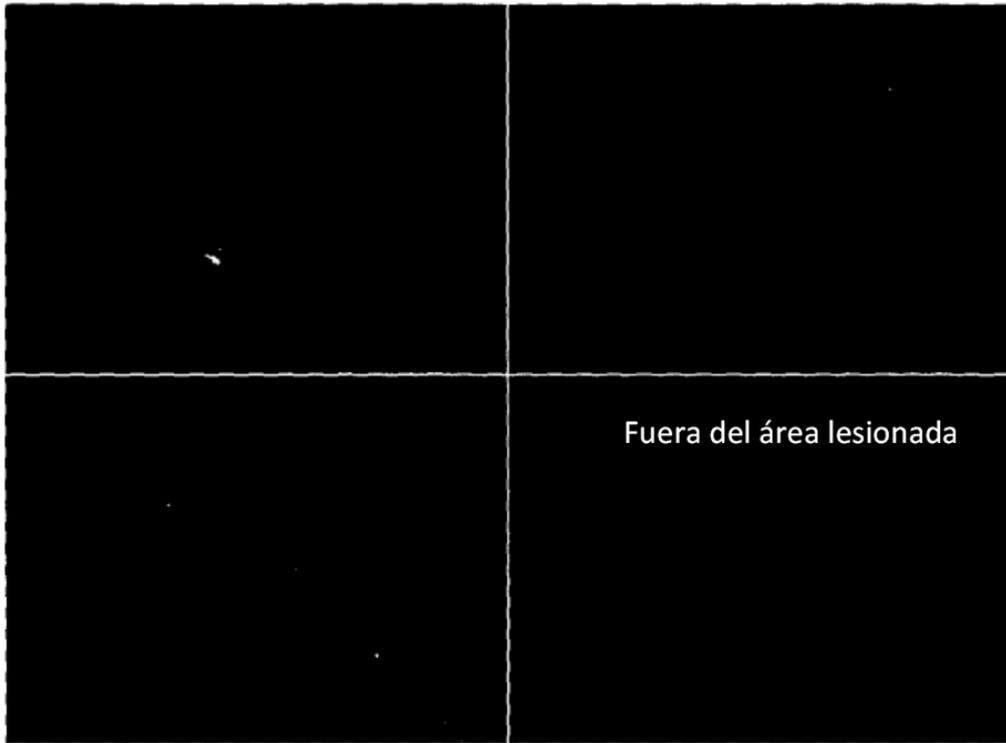


Figura 11

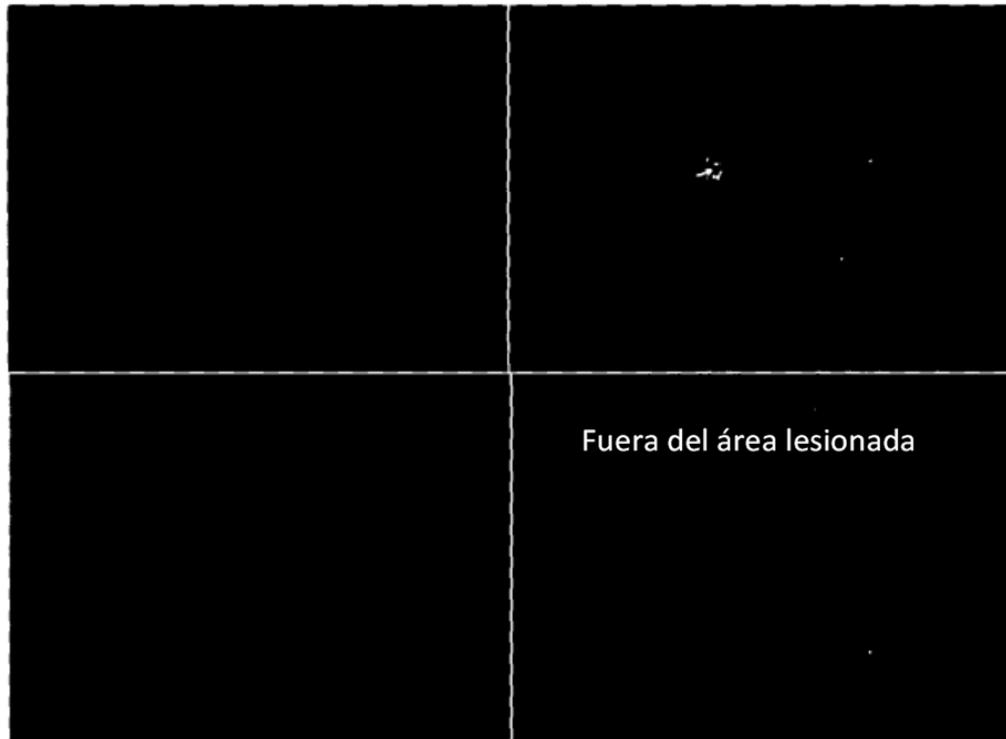


Figura 12

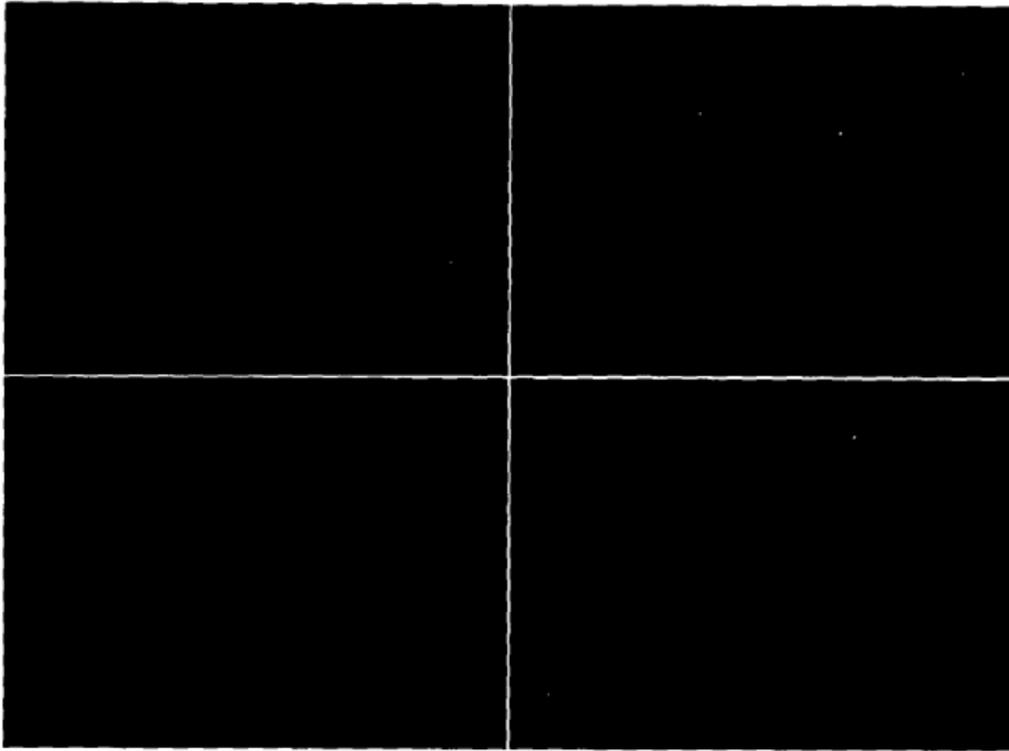


Figura 13

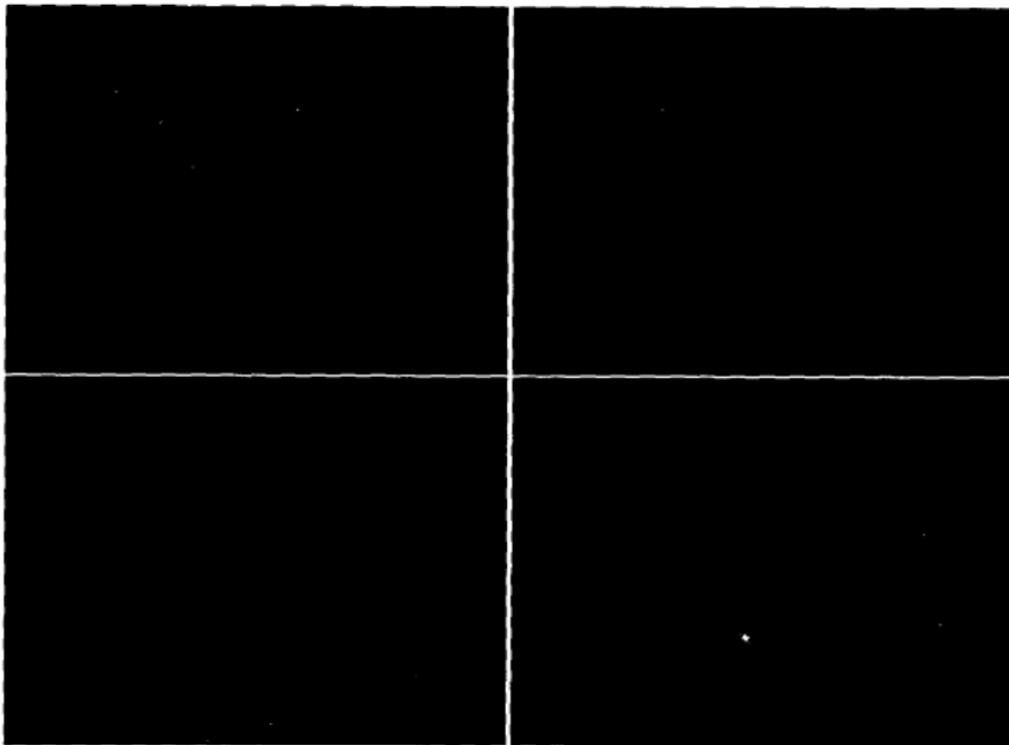


Figura 14

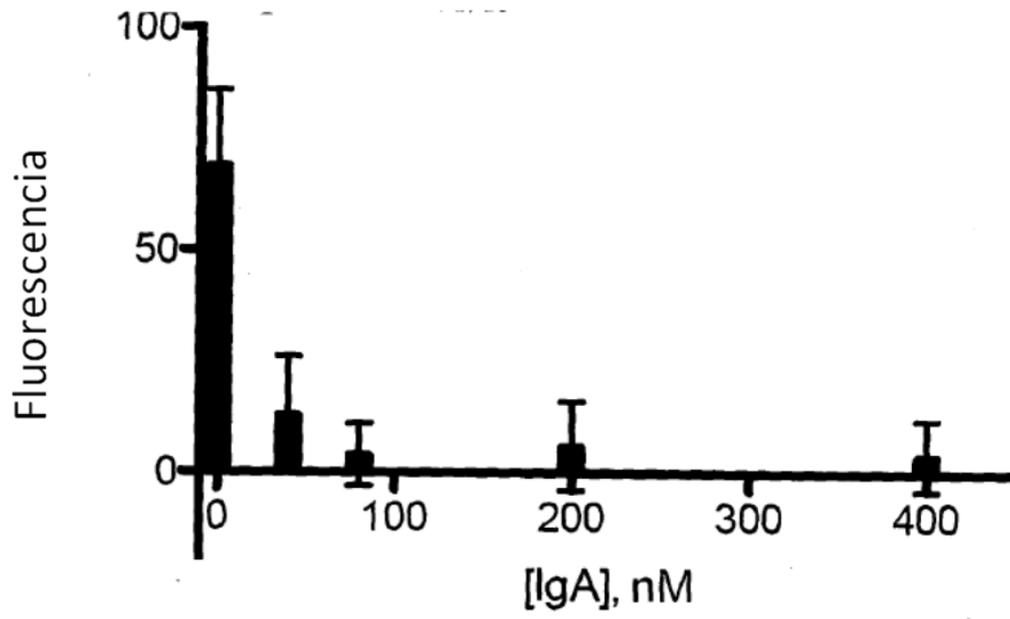


Figura 15

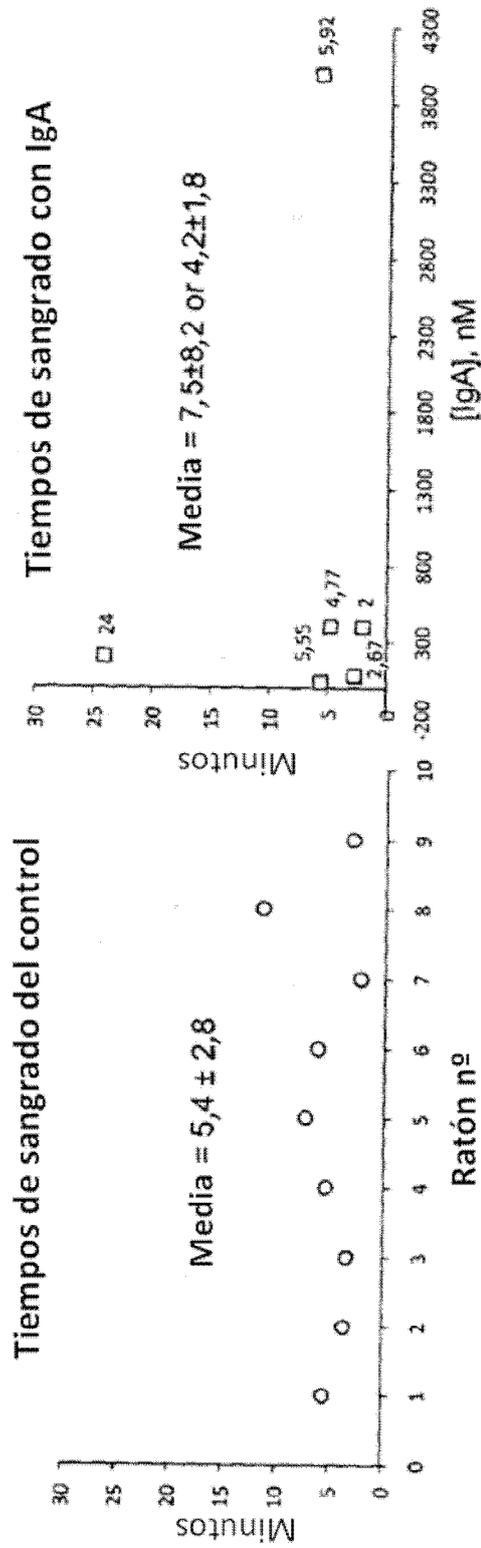


Figura 16

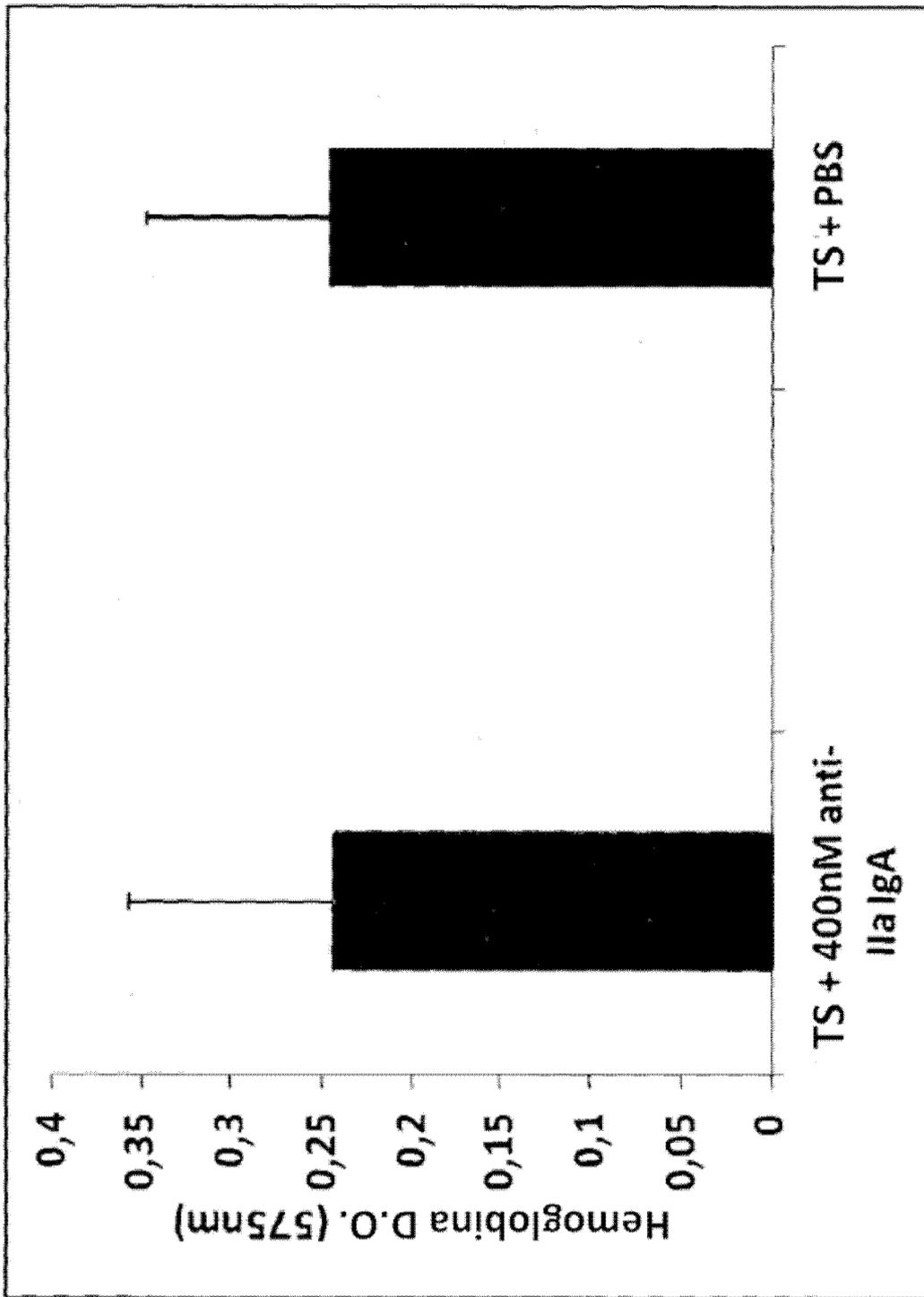


Figura 17

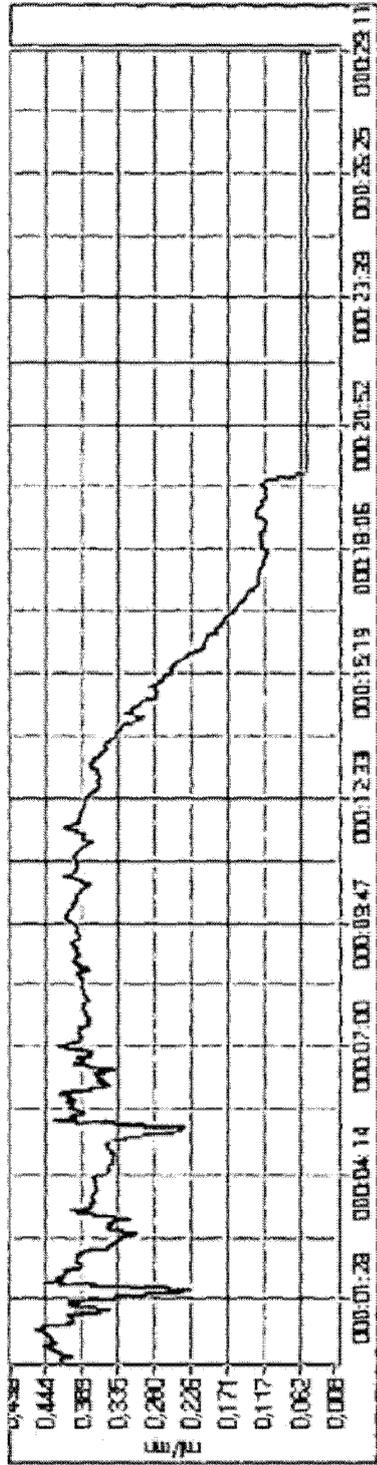


Figura 18A

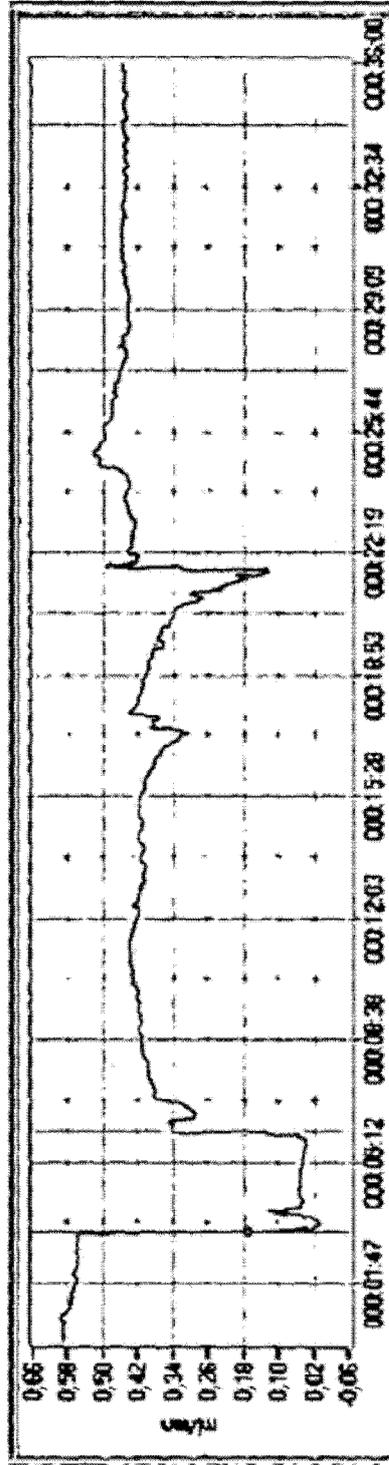


Figura 18B

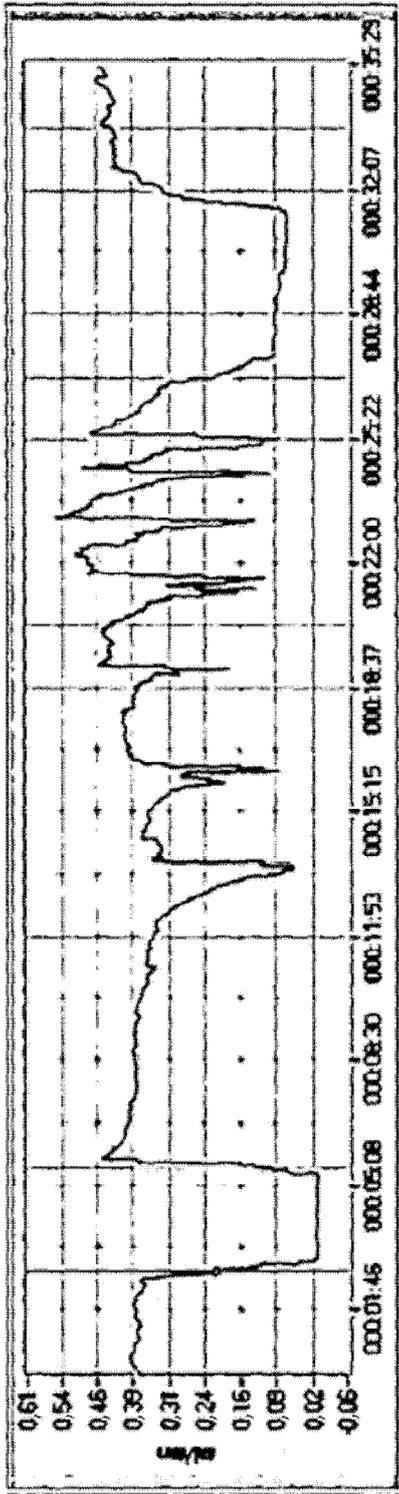


Figura 18C

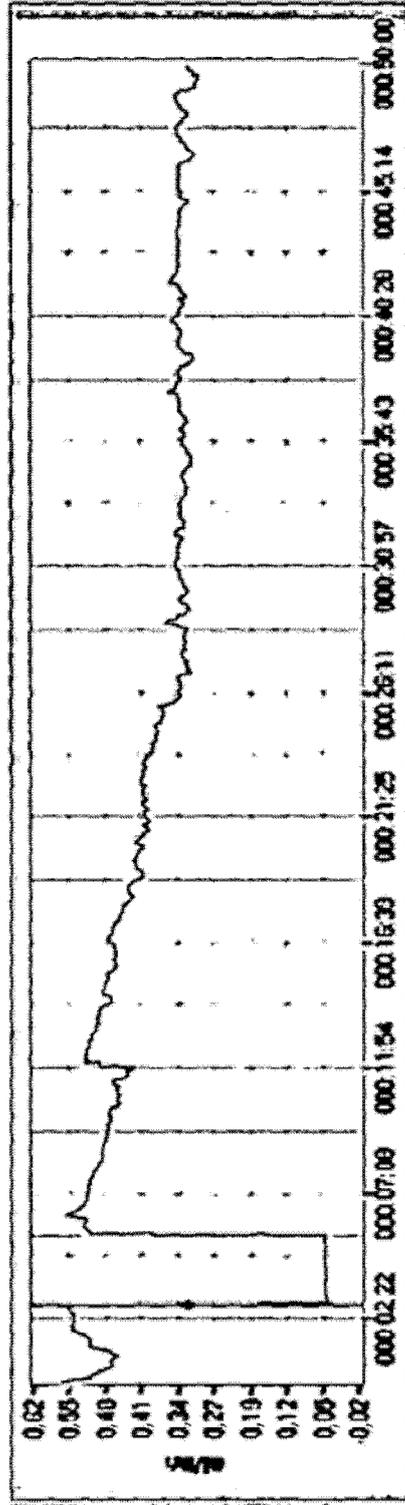


Figura 18D

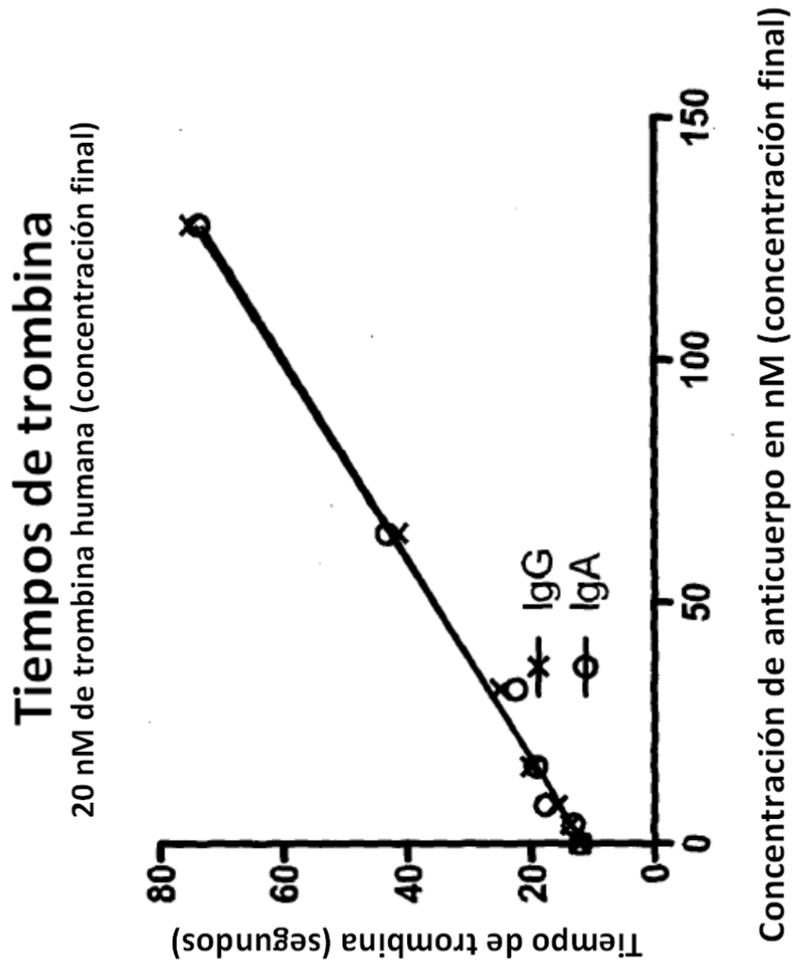


Figura 19

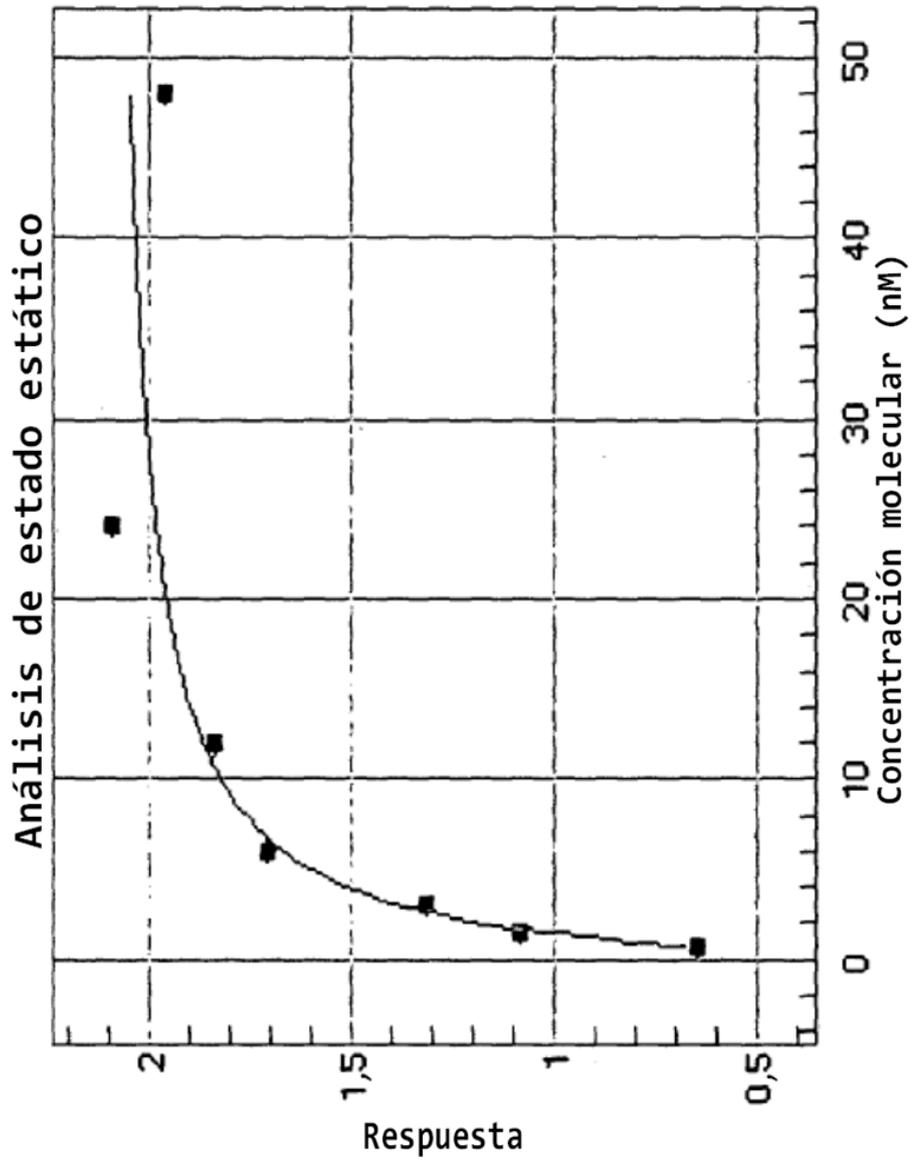


Figura 20

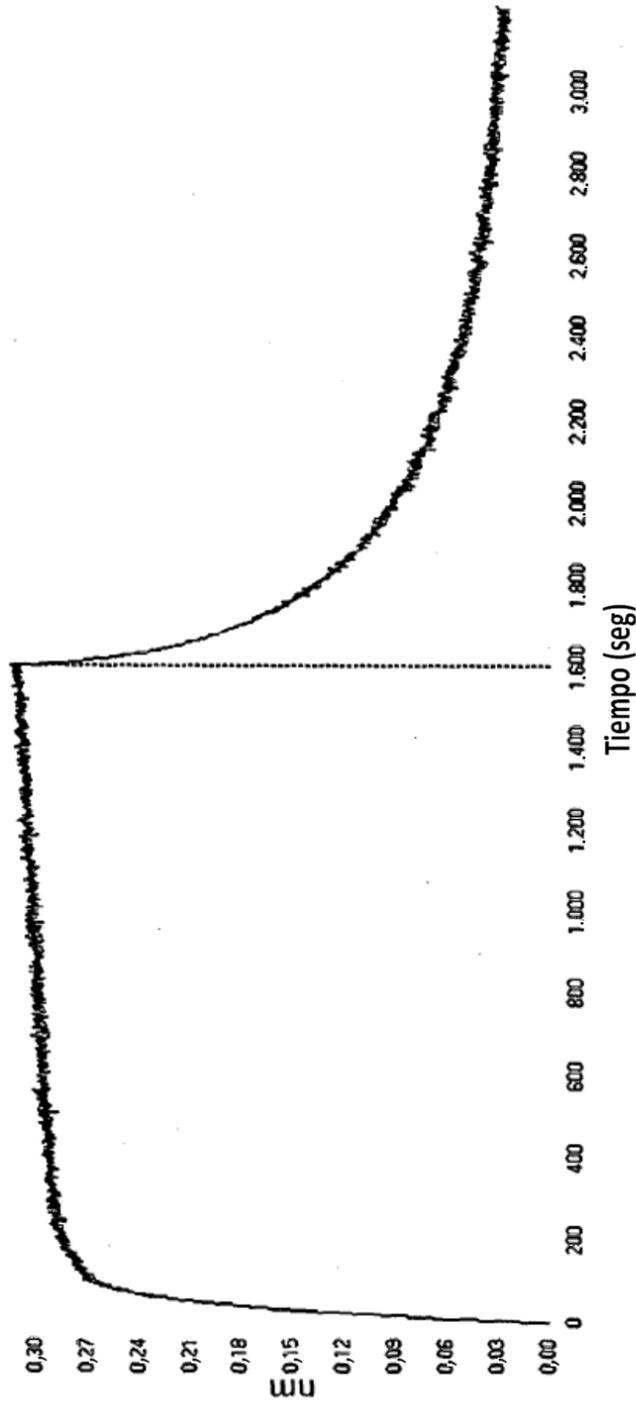


Figura 21

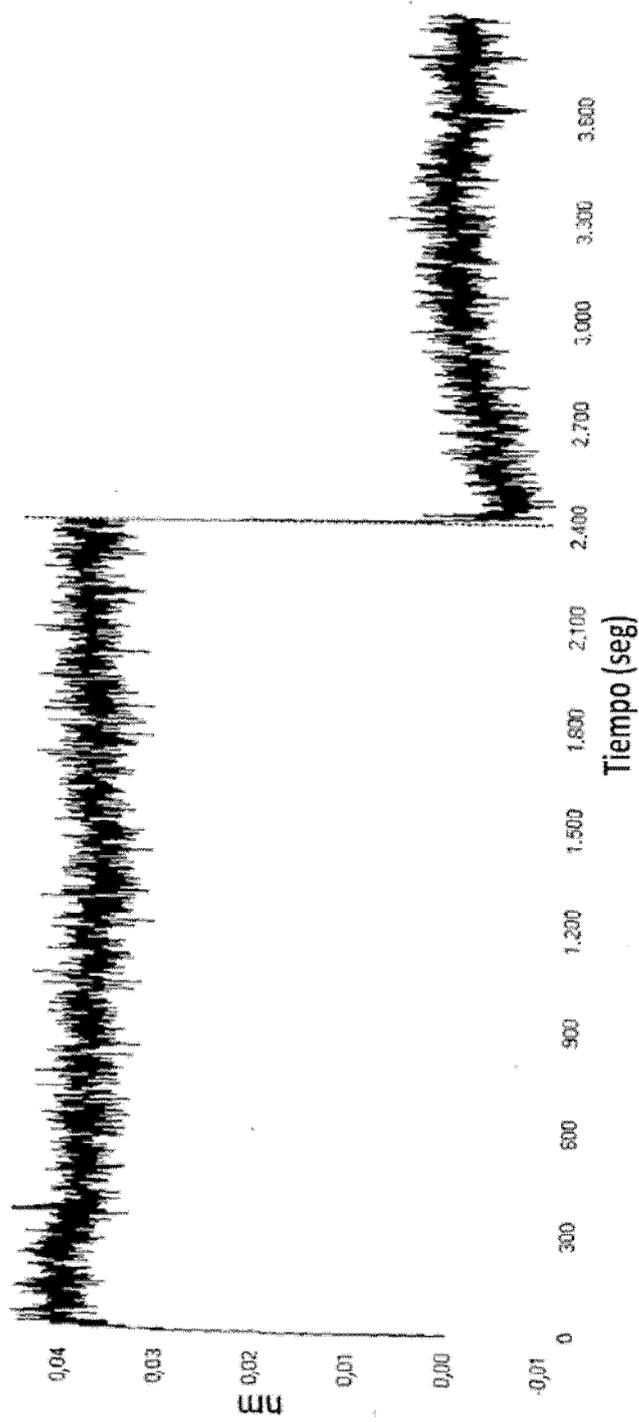


Figura 22