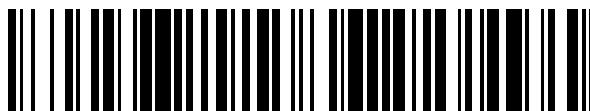


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 665**

51 Int. Cl.:

C07K 16/38 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009** **E 09793543 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014** **EP 2379600**

54 Título: **Anticuerpos contra inhibidor de la vía de factor tisular**

30 Prioridad:

22.12.2008 EP 08172520

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

06.05.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

HILDEN, IDA;

KROGH, BERIT OLSEN;

CLAUSEN, JES THORN;

OLSEN, OLE HVILSTED;

BREINHOLT, JENS;

LAURITZEN, BRIAN y

SØRENSEN, BRIT BINOW

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 458 665 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 contra inhibidor de la vía de factor tisular

5 **Campo de la Invención**

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a un inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI).

10 **Antecedentes de la Invención**

[0002] En sujetos con una coagulopatía, tal como en seres humanos con hemofilia A y B, varios pasos de la cascada de coagulación se hacen disfuncionales debido, por ejemplo, a la ausencia o presencia insuficiente de un factor de coagulación. Esa disfunción de una parte de la cascada de coagulación da por resultado coagulación de la sangre insuficiente y sangrado potencialmente amenazante para la vida, o daño a órganos internos, tales como las articulaciones. Sujetos tales como seres humanos con hemofilia A y B pueden recibir terapia de reemplazo de factor de coagulación tal como FVIIIa o FIXa exógeno, respectivamente. Sin embargo, esos pacientes están en riesgo de desarrollar "inhibidores" (anticuerpos) a esos factores exógenos, haciendo inefectiva la terapia que anteriormente era eficiente. Además, los factores de coagulación exógenos sólo se pueden administrar por vía intravenosa, lo cual es de inconveniencia y malestar considerables para los pacientes. Por ejemplo, los bebés y niños que gatean pueden tener catéteres intravenosos quirúrgicamente insertados en una vena del pecho, para que sea garantizado el acceso venoso. Esto los deja en gran riesgo de desarrollar infecciones bacterianas. Los sujetos con una coagulopatía sólo pueden recibir terapia después de que haya comenzado un sangrado, más que como una medida de precaución, que a menudo causa efecto en su calidad de vida general.

[0003] Por lo tanto, aún hay muchas necesidades médicas no satisfechas en la comunidad hemofílica, en particular, y en sujetos con coagulopatías, en general.

[0004] Cuando la pared de un vaso está lesionada, el factor tisular (TF) está expuesto a los contenidos de sangre circulante y TF forma un complejo con el Factor VII/Factor VII activado (FVII/FVIIa) sobre la superficie de células que tienen TF. Esto conduce a la activación del Factor X (FX) a FXa que junto con FVa genera una cantidad limitada de trombina (FIIa). Pequeñas cantidades de trombina activan las plaquetas, que dan por resultado exposición de superficie de fosfolípidos que soporta la unión del complejo de tenasa que consiste de FVIIIa/FIXa.

[0005] El complejo de tenasa produce grandes cantidades de FXa, que subsecuentemente facilita una ráfaga de trombina completa. Una ráfaga de trombina completa es necesaria para la formación de una estructura de fibrina mecánicamente fuerte y estabilización del tapón hemostático. FVIII o FIX está ausente o presente a niveles bajos en pacientes con hemofilia, y debido a la falta de actividad de tenasa, la capacidad para generar FXa es baja e insuficiente para soportar la fase de propagación de la coagulación. Por el contrario, la fase de inicio mediada por TF no es dependiente de la formación del complejo de tenasa. Sin embargo, la vía de TF, poco después de una generación de FXa inicial, será bloqueada por inhibidores del plasma

[0006] El inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI) regula descendentemente la coagulación en curso al neutralizar la actividad catalítica de FXa y al inhibir el complejo TF-FVIIa en presencia de FXa. TFPI ya sea que inhiba el complejo TF/FVIIa/FXa sobre la superficie celular o inhiba el FXa liberado seguido por inhibición de FVIIa/TF.

[0007] Int. Jour. Haem. Fibrin (1995), 6, 5, 388-394 divulga un anticuerpo TFPI policlonal de cabra. Tras la publicación de este artículo, Warn Cramer y Rapaport utilizaron el mismo método que el descrito para cultivar un pAb de cabra (Arterioscler. Thromb. (1993), 13, 1551-1557). Este pAb se probó y se encontró que exhibe la propiedad indeseable de dar lugar a una reducción en el número de plaquetas (véase Fig. 4).

[0008] Blood; Amer. Soc. Haem (2004), 104, 11, 788 divulga un anticuerpo TFPI que se dirige al dominio K2 de TFPI (véase líneas 23-24 del resumen). No se proporciona información adicional sobre el anticuerpo.

[0009] Throm. Res (1991), 64, 2, 213-222 es un artículo que expone el efecto que tiene LACI (es decir TFPI) en la coagulación inducida por tromboplastina en plasma normal y hemofílico. El artículo divulga un anticuerpo TFPI policlonal de conejo (pAb) y anticuerpo TFPI monoclonal de ratón (mAb) (véase sección de Materiales, página 215), usado para evaluar la función LACI. Este artículo no expone nada sobre la estructura de los anticuerpos que se usaron para evaluar la función LACI, ni examina las propiedades biológicas de pAb y mAb que fueron usados en el experimento del autor.

[0010] mAb 2974 es un anticuerpo monoclonal FTPI comercialmente disponible, producido por R&D Systems y disponible para fines de investigación únicamente.

65 **Resumen de la Invención**

[0011] Los inventores han identificado anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al inhibidor de la vía de

factor tisular ("TFPI", algunas veces denominado "TFPI1") y de esta manera modula su actividad. La presente invención se refiere a estos anticuerpos y a otros anticuerpos relacionados que se derivan de estos anticuerpos o tienen propiedades de unión similares a estos anticuerpos.

[0012] Por consiguiente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI) y que reducen el tiempo de coagulación en, por ejemplo, (a) plasma deficiente en FVIII humano y/o (b) sangre entera humana.

[0013] La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse específicamente al dominio K2 de TFPI, donde dicho anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que omprime el residuo R17 de SEC ID n.º 2 y el KD de dicho anticuerpo es menor de 0.8 nM, como se determina utilizando resonancia plasmon superficial.

[0014] Un anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 4 y la región variable de cadena pesada de SEC ID n.º: 8. Otro anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 15 y la región variable de cadena pesada de SEC ID n.º: 18.

[0015] La invención también provee polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención, tales como polinucleótidos que codifican la cadena ligera de un anticuerpo y/o la cadena pesada de un anticuerpo de la invención.

[0016] La invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o polinucleótido de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0017] Los anticuerpos, polinucleótidos y composiciones de la invención también se proveen para usarse en (a) el tratamiento o prevención de una coagulopatía (trastorno de sangrado) o (b) la estimulación de coagulación sanguínea. Es decir, la invención provee un método para (a) el tratamiento o prevención de una coagulopatía (trastorno de sangrado) o (b) la estimulación de coagulación sanguínea, el método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo, polinucleótido o composición de la invención.

[0018] Además, la invención provee regímenes de dosis del anticuerpo monoclonal de la invención.

Breve Descripción de las Figuras

[0019]

La figura 1 muestra las secuencias de los dominios VH (A) y VL (B) de anti-TFPI4F36A1B2 de ratón (denominado aquí también MuTFPI4F36 o 4F36), alineadas con las secuencias para la línea germinal humana y la versión injertada con CDR inicial de TFPI4F36 humanizado. El esquema de numeración de Kabat está indicado arriba de las secuencias.

La figura 2 muestra las secuencias de nucleótidos y secuencias de polipéptido traducidas para las secuencias de VH y VL del anticuerpo TFPI4F36A1B2 de ratón (MuTFPI4F36).

La figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera (A) y pesada (B) de fragmentos Fab del anticuerpo 4F36 de ratón, MuTFPI4F36. La numeración arriba de las secuencias se muestra en conformidad con Kabat. Posiciones correspondientes a lazos de CDR están en texto resaltado subrayado en negrita en la numeración de Kabat. Los residuos de aminoácidos que constituyen el paratopo son resaltados en texto subrayado y en negrita. El paratopo es determinado a partir de la estructura de rayos X del complejo entre el Fab de MuTFPI4F36 y el dominio TFPI K2 y se define como residuos en el Fab que tienen un átomo pesado dentro de una distancia de menos de 4 Å de un átomo pesado en K2.

La figura 4 muestra la secuencia de TFPI (secuencia de péptido de señal omitida). Los dominios de Kunitz se muestran en negrita: dominio de TFPI Kunitz 1 = aminoácidos 26 a 76; dominio de TFPI Kunitz 2 = aminoácidos 97-147; dominio de TFPI Kunitz 3 = aminoácidos 188-238. La parte C-terminal de TFPI se muestra en cursiva en los aminoácidos 240 a 276.

La figura 5 muestra la accesibilidad relativa de residuos en TFPI. Los residuos que tienen una accesibilidad mayor que 40% son los aminoácidos 94-95, 98, 100-110, 118-121, 123-124, 131, 134, 138-142 y 144-145.

La figura 6 muestra un análisis de SEC HPLC de un complejo entre el dominio de TFPI Kunitz 2 (K2) y el fragmento Fab de MuTFPI4F36 (Fab). Cromatogramas de SEC-HPLC detectados a UV 280 nm de K2 libre (línea sólida, t_r 13.1 min, pico mostrado a 13.134), Fab libre (línea discontinua, t_r 11.7 min, pico mostrado a 11.676) y complejo (línea punteada, t_r 11.5 min, pico mostrado a 11.496). La muestra del complejo contenía ~20% de exceso de K2.

La figura 7 muestra la estructura global del complejo Fab:K2 de MuTFPI4F36. Las cadenas ligeras se muestran en gris pálido y las cadenas pesadas se muestran en gris oscuro. Los lazos de CDR como se define de conformidad con el

esquema de Kabat se marcan como L1 a L3 y H1 a H3.

La figura 8 muestra la estructura del dominio K2 de TFPI cuando está en un complejo con Fab de MuTFPI4F36 (no se muestra la molécula de Fab). Los N- y C-terminales y elementos estructurales secundarios están marcados.

La figura 9 muestra una superposición de esqueleto de estructuras de K2. Se muestran diferencias en estructura entre solución de K2, K2 está en complejo con Fab de MuTFPI4F36 y K2 en complejo con tripsina de porcino.

La figura 10 muestra el epítipo de unión de MuTFPI4F36 en K2. (A) Representación dibujada del dominio de K2 de TFPI con cadenas laterales de residuos incluidas en el epítipo de unión representado por bolas y varillas. (B) es como A, pero con superficie añadida. (C) Epítipo de unión mapeado sobre la secuencia primaria. Mayúsculas en negrita, letras cursivas y subrayadas corresponden a residuos en el epítipo de unión K2 que hace contacto con la cadena pesada de Fab de MuTFPI4F36 únicamente (posiciones 10, 11, 13, 28, 31, 33 y 35), cadena ligera únicamente (posiciones 21, 23 y 50), y tanto con cadena pesada como ligera (17, 19, 34 y 36), respectivamente. Los elementos estructurales secundarios (h = hélice, s = lámina) están indicados (hélices en las posiciones 5-8 y 50-56 y láminas en las posiciones 20-26 y 31-37). Los residuos resaltados en gris (posiciones 1-2 y 59-66) están presentes en la proteína expresada, pero no se observan en la estructura de cristal debido al N- y C-terminal que es flexible.

La figura 11 muestra una comparación de las trazas de esqueleto de complejos de K2: Fab MuTFPI4F36 y K2: Fab HzTFPI4F36, que demuestran los modos de unión idénticos para los fragmentos Fab de MuTFPI4F36 de ratón y HzTFPI4F36 humanizado. Fab K2: MuTFPI4F36 se muestra en gris y Fab K2:HzTFPI4F36 en negro. Las estructuras están superpuestas para optimizar la concordancia entre la región variable de los fragmentos Fab.

La figura 12 muestra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-TFPI (mAbs) sobre la activación inducida por TF/FVIIa de FX sobre la superficie de HUVECs estimulada con TNF α /IL1 β . La activación de FX se midió en presencia de 0-20 nM mAb (mAbTFPI 2021 o mAb 2974), 50 pM FVIIa (NovoSeven®) y 50 nM FX en regulador de pH con 25 mM de HEPES, 137 mM de NaCl, 3.5 mM de KCl, 5 mM de CaCl₂, 1 mg/ml de BSA (0.1%) pH 7.4 que se superpuso a una monocapa de HUVECs. La actividad de Fxa generada se determinó en una prueba amidolítica con S-2765 mediada por el incremento en absorbancia a 405 nM.

La figura 13 muestra el efecto de anti-TFPI mAbs sobre la inhibición por TFPI de activación de FX inducida por TF/FVIIa sobre la superficie de células MDA-MB. La activación de FX se midió en presencia de 0-20 nM de mAb (Hz mAbTFPI 2021 o mAb 2974), 2.5 nM de fl-TFPI, 100 pM de FVIIa y 50 nM de FX en regulador de pH con 25 mM de HEPES, 137 mM de NaCl, 3.5 mM de KCl, 5 mM de CaCl, 1 mg/ml de BSA (0.1%) pH 7.4 que fue recubierto una monocapa de células MDA-MB 231. La actividad de Fxa generada se determinó en una prueba amidolítica con S-2765 medido por el incremento en absorbancia a 405 nM.

La figura 14 muestra el efecto de sustituciones individuales del aminoácido alanina de residuos selectos dentro del dominio TFPI Kunitz 2 sobre la unión a mAbTFPI 2021 ("mAb4F36") y mAb2974 (n = 2). Los residuos selectos son parte del epítipo de unión mAbTFPI 2021. La numeración de los residuos de aminoácidos es como se indica en la figura 10C.

La figura 15 muestra el tiempo de sangrado de la cutícula y pérdida de sangre medida en conejos hemofílicos transitorios después del tratamiento con IgG de control (Hemofilia) o con el anticuerpo anti-TFPI de ratón, TFPI-4F36A1B2 ("4F36", MuTFPI4F36).

La figura 16 muestra el tiempo de sangrado de la cutícula (observaciones individuales; media $\pm$ SEM) y pérdida de sangre (media+SEM) en un tratamiento "sobre demanda" de conejos con hemofilia inducida por anticuerpo, tratados con HzTFPI4F36 ("anti-TFPI", mAbTFPI 2021) (2 mg/kg) o NovoSeven (9 mg/kg) 5 minutos después de la inducción de sangrado. El sangrado se observó durante 1 hora (3600 seg).

La figura 17 muestra el tiempo de sangrado de la cutícula (observaciones individuales; media $\pm$ SEM) y pérdida de sangre (media+SEM) en conejos con hemofilia inducida por anticuerpo, cuando son pre-tratados con HzTFPI4F36 ("anti-TFPI", mAbTFPI 2021) (dosis: 0.5, 1, 2 mg/kg) o un anticuerpo de control de isotipo 35 minutos antes de la inducción del sangrado. El sangrado se observó durante 1 hora (3600 seg).

La figura 18 muestra el número de plaquetas medido en animales individuales, después de estimulación con anticuerpo anti-FVIII, administración de un anticuerpo anti-TFPI ("anti-TFPI ab", MuTFPI4F36) y después se hizo sangrar. Esto se llevó a cabo en un modelo de hemofilia de control y en presencia del anticuerpo 4F36 anti-TFPI de ratón (MuTFPI4F36) como se describe en la presente.

La figura 19 muestra la concentración en el plasma de HzTFPI4F36 libre (mAbTFPI 2021) en conejos dosificados con 20 mg/kg de HzTFPI4F36 a 0 h. Experimentos de sangrado de la cutícula se realizaron a 96 h (4 días), 168 h (7 días) y 240 h (10 días). Las líneas punteadas indican el intervalo de 'concentración efectiva' de HzTFPI4F36 como se encuentra en un estudio de dosis-respuesta (véase figura 17).

La figura 20: Panel de la izquierda: plasma HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) (eje de la izquierda ○) y tiempo de sangrado de la cutícula (media $\pm$ SEM; ■). Panel de la derecha: HzTFPI4F36 en el plasma (mAbTFPI 2021) (eje de la izquierda ○) y pérdida de sangre (media $\pm$ SEM; ■) en conejos con hemofilia inducida por anticuerpo, cuando se pretrataron con 20 mg/kg de HzTFPI4F36 (n=8) o anticuerpo de control de isotipo (n = 12) a 4, 7 o 10 días antes de la inducción de sangrado. El sangrado se observó durante 1 hora (3600 s).

La figura 21 muestra los niveles de concentración en el plasma después de la administración de IV y SC de HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) a monos. En las tres gráficas inferiores, a dos monos se administraron tres dosis de HzTFPI4F36 con intervalo de dos semanas. En la izquierda inferior, tres dosis de 2, 20 y 80 mg/kg se administraron, en la mitad inferior, tres dosis de 20, 80 y 160 mg/kg se administraron; a la derecha inferior, tres dosis de 80, 160 y 200 mg/kg se dosificaron. A la izquierda superior, una sola dosis de 20 mg/kg se administró a tres monos; a la derecha superior como dosis IV individual se administraron a tres monos. En las gráficas, los puntos representan observaciones individuales, mientras que la línea representa el ajuste de modelo.

La figura 22 muestra una simulación de 1 mg/kg HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) administrada SC diariamente. La línea horizontal sólida representa niveles de concentración en el plasma simulados y la línea horizontal punteada la concentración eficaz superior como se deduce a partir de los datos de efecto.

La figura 23 muestra una simulación de 15 mg/kg de HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021), administrado intravenosamente cada tercera semana. La línea horizontal sólida representa niveles de concentración en el plasma simulados y la línea horizontal punteada la concentración eficaz superior como se deduce a partir de los datos de efecto.

La figura 24 muestra una simulación de 20 mg/kg de HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021), administrado intravenosamente cada segunda semana. La línea horizontal sólida representa niveles de concentración en el plasma simulados y la línea horizontal punteada la saturación objetivo esperada como se deduce a partir del estudio de efecto.

Breve Descripción del Listado de Secuencias

[0020]

SEC ID n.º: 1 da la secuencia de aminoácidos de TFPI humano (secuencia de péptido de señal omitida).

SEC ID n.º: 2 da la secuencia de aminoácidos de un constructo usado para determinar el epítipo de unión de un anticuerpo. El constructo comprende los aminoácidos 91 a 150 de TFPI humano y una etiqueta His₆ C-terminal.

SEC ID n.ºs: 3, 5 y 4 dan las secuencias de polinucleótido (sentido y anti-sentido) y polipéptido para el dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal MuTFPI4F36 (TFPI-4F36A1B2). SEC ID n.º: 6 da la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal MuTFPI4F36 (TFPI-4F36A1B2). Las secuencias de péptido de señal son omitidas.

SEC ID n.ºs: 7, 9 y 8 dan las secuencias de polinucleótido (sentido y anti-sentido) y polipéptido para el dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal MuTFPI4F36 (TFPI-4F36A1B2). SEC ID n.º: 10 da la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal MuTFPI4F36 (TFPI-4F36A1B2). Las secuencias de péptido de señal son omitidas.

SEC ID n.º: 11 da la secuencia de un cebador inversas usado para amplificación de dominio variable de cadena pesada y SEC ID n.º: 12 da la secuencia de un cebador inversas usado para amplificación de cadena ligera.

SEC ID n.ºs: 13-15 proveen las secuencias de polinucleótido de sentido, polinucleótido de antisentido y polipéptido, respectivamente, para el dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021). Las secuencias de péptido de señal son omitidas.

SEC ID n.ºs: 16-18 proveen las secuencias de polinucleótido de sentido, polinucleótido de antisentido y polipéptido, respectivamente, para el dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021).

SEC ID n.ºs: 19-21 proveen las secuencias de polinucleótido de sentido, polinucleótido de antisentido y polipéptido, respectivamente, para la cadena ligera (LC) del anticuerpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021).

SEC ID n.ºs: 22-24 proveen las secuencias de polinucleótido de sentido, polinucleótido de antisentido y polipéptido, respectivamente, para la cadena pesada (HC) del anticuerpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021). Las secuencias de péptido de señal son omitidas.

SEC ID n.ºs: 25-26 proveen las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos, respectivamente, para el dominio variable de cadena ligera del HzTFPI4F36 injertado con CDR. Las secuencias de péptido de señal son omitidas.

SEC ID n.º: 27-28 proveen las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos, respectivamente, del dominio variable de cadena pesada del H₂TFPI4F36 injertado con CDR. Las secuencias de péptido de señal son omitidas.

SEC ID n.º: 29 provee la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del H₂TFPI4F36 injertado con CDR (cadena kappa humana). La secuencia de péptido de señal es omitida.

SEC ID n.º: 30 provee la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del H₂TFPI4F36 injertado con CDR, que es una IgG4 humana (S241P). La secuencia de péptido de señal es omitida.

SEC ID n.º: 31 provee la secuencia de línea germinal, VKII_A18/JK4, usada para humanización de la cadena ligera de MuTFPI4F36. La secuencia de péptido de señal es omitida.

SEC ID n.º: 32 provee la secuencia de línea germinal, VH3_21/JH6, usada para humanización de la cadena pesada de MuTFPI4F36. La secuencia de péptido de señal es omitida.

SEC ID n.º: 33 provee la secuencia de aminoácidos del Fab de cadena pesada de MuTFPI4F36AIB2. El péptido de señal es omitido.

SEC ID n.º: 34 provee la secuencia de aminoácidos del Fab de cadena pesada d H₂TFPI4F36. El péptido de señal es omitido.

Descripción Detallada de la Invención

[0021] La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a TFPI. Los anticuerpos preferiblemente se unen específicamente a TFPI, es decir, se unen a TFPI pero no se unen, o se unen a una afinidad más baja, a otras moléculas. En particular, la invención se refiere a anticuerpos que se unen a TFPI y que modulan su actividad. Los anticuerpos de la invención por lo tanto pueden poseer la capacidad de acortar el tiempo de coagulación. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede tener la capacidad de acortar el tiempo de coagulación en el plasma deficiente en FVIII humano o de reducir el tiempo para coagular como se mide en un análisis de tromboelastografía (TEG) de sangre entera humana. La invención también se refiere a usos para esos anticuerpos, tales como usos terapéuticos y farmacéuticos.

[0022] El término TFPI, como se usa en la presente, abarca cualquier forma de TFPI que existe naturalmente que se puede derivar de cualquier organismo adecuado. Por ejemplo, TFPI para uso como se describe en la presente puede ser un TFPI de mamífero, tal como TFPI de humano, ratón, rata, primate, bovino, ovino o porcino. Preferiblemente, el TFPI es TFPI de humano. El TFPI puede ser una forma madura de TFPI tal como una proteína TFPI que ha pasado por procesamiento post-traduccional dentro de una célula adecuada. Esa proteína TFPI madura, por ejemplo, puede ser glicosilada. El TFPI puede ser una proteína TFPI de longitud completa. El término TFPI también abarca variantes, isoformas y otros homólogos de esas moléculas de TFPI. Las moléculas de TFPI variantes generalmente se caracterizarán por tener el mismo tipo de actividad que el TFPI que existe naturalmente, tal como la capacidad para neutralizar la actividad catalítica de FXa, o la capacidad para inhibir un complejo de TF-FVIIa/FXa.

[0023] Un anticuerpo de la invención tendrá la capacidad para unirse a TFPI. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención se unirá específicamente a TFPI. Es decir, un anticuerpo de la invención preferiblemente se unirá a TFPI con mayor afinidad de unión que aquella a la cual se une a otra molécula. Un anticuerpo de la invención puede tener la capacidad para unirse o se une específicamente a una molécula de TFPI como se describe en la presente tal como cualquier molécula objetivo como se describe en la presente.

[0024] El término “afinidad de unión” se usa en la presente como una medida de la resistencia de una interacción no covalente entre dos moléculas, por ejemplo, y anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno. El término “afinidad de unión” se usa para describir interacciones monovalentes (actividad intrínseca).

[0025] La afinidad de unión entre dos moléculas, p. ej., un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno, a través de una interacción monovalente puede ser cuantificada por determinación de la constante de disociación (K_D). A su vez, K_D se puede determinar al medir la cinética de formación de complejo y disociación, p. ej., por el método de SPR (Biacore). Las constantes de proporción correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente se refieren como las constantes de la proporción de asociación k_a (o $k_{\text{asociación}}$) y constante de la tasa de disociación k_d . (o $k_{\text{disociación}}$), respectivamente. K_D está relacionada con k_a y k_d a través de la ecuación $K_D = k_d/k_a$.

[0026] Siguiendo la definición anterior las afinidades de unión asociadas con diferentes interacciones moleculares, p. ej., la comparación de la afinidad de unión de diferentes anticuerpos para un antígeno dado, se pueden comparar mediante la comparación de los valores de K_D para los complejos de anticuerpo/antígeno individuales.

[0027] De manera similar, la especificidad de una interacción se puede evaluar mediante la determinación y comparación del valor de K_D para la interacción de interés, p. ej., una interacción específica entre un anticuerpo y un antígeno, con el valor de K_D de una interacción que no es de interés.

[0028] Típicamente, la K_D para el anticuerpo con respecto al objetivo será 2 veces, preferiblemente 5 veces, muy preferiblemente 10 veces menor que K_D con respecto al otro, molécula no objetivo tal como material no relacionado o material acompañante en el ambiente. Muy preferiblemente, la K_D será 50 veces menos, tal como 100 veces menos, o 200 veces menos; muy preferiblemente aún 500 veces menos, tal como 1000 veces menos, o 10 000 veces menos.

[0029] El valor de esta constante de disociación se puede determinar directamente por métodos bien conocidos, y se puede calcular incluso para mezclas complejas por métodos tales como aquellos expuestos, por ejemplo, en Caceci et al. (Byte 9: 340-362, 1984). Por ejemplo, la K_D se puede establecer usando una prueba de unión con filtro de nitrocelulosa de doble filtro tal como aquella descrita por Wong y Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432, 1993). Otras pruebas estándares para evaluar la capacidad de unión de ligandos tales como anticuerpos hacia objetivos se conocen en la técnica, que incluyen por ejemplo, ELISAs, Western blots, RIAs, y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión y afinidad de unión del anticuerpo también se pueden evaluar por pruebas estándares conocidas en la técnica, tales como resonancia de plasmón superficial (SPR), p. ej., al usar un sistema de Biacore™.

[0030] Una prueba de unión competitiva se puede conducir en la cual la unión del anticuerpo al objetivo se compara con la unión del objetivo por otro ligando de ese objetivo, tal como otro anticuerpo. La concentración a la cual ocurre el 50% de la inhibición se conoce como K_i . Bajo condiciones ideales, la K_i es equivalente a K_D . El valor de K_i nunca será menor que la K_D , por lo que la medición de K_i puede ser convenientemente sustituida para proveer un límite superior para K_D .

[0031] Un anticuerpo de la invención puede tener una K_D para su objetivo de 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos, o 1×10^{-9} M o menos, o 1×10^{-10} M o menos, 1×10^{-11} M o menos, o 1×10^{-12} M o menos.

[0032] Un anticuerpo que se une específicamente a su objetivo se puede unir a su objetivo con una afinidad alta, es decir, que presenta una K_D baja como se describió anteriormente, y se puede unir a otras, moléculas no objetivo con una afinidad baja. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a moléculas no objetivo con una K_D de 1×10^{-6} M o más, muy preferiblemente 1×10^{-5} M o más, muy preferiblemente 1×10^{-4} M o más, muy preferiblemente 1×10^{-3} M o más, muy preferiblemente aún 1×10^{-2} M o más. Un anticuerpo de la invención es preferiblemente capaz de unirse a su objetivo con una afinidad que es por lo menos dos veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces 200 veces, 500 veces, 1000 veces o 10 000 veces o mayor que su afinidad para unirse a otra molécula no objetivo.

[0033] La molécula objetivo puede ser cualquier molécula de TFPI como se describe en la presente, tal como una molécula de TFPI que existe naturalmente, una molécula de TFPI completamente madura o una molécula de TFPI de longitud completa. Las moléculas de TFPI preferidas son moléculas de TFPI de mamífero completamente maduras, que ocurren naturalmente, de longitud completa. Por ejemplo, la molécula de TFPI puede consistir en, o puede comprender, la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 1 o un fragmento u otra variante del mismo como se describe en la presente.

[0034] La molécula objetivo puede ser una variante de una molécula de TFPI tal como un fragmento de una molécula de TFPI. Por ejemplo, la molécula objetivo puede ser un fragmento u otra variante de TFPI que mantenga un epítipo adecuado para unión a anticuerpo. Por ejemplo, la molécula objetivo puede ser un fragmento u otra variante de TFPI que retenga un epítipo como se describe en la presente. La molécula objetivo puede comprender un epítipo.

[0035] En una modalidad, la molécula objetivo es una molécula de TFPI de longitud completa. La molécula de TFPI de longitud completa puede comprender un primer, segundo y tercer dominio de Kunitz como se describe en la presente. La molécula de TFPI de longitud completa puede comprender un primer, segundo y tercer dominio de Kunitz como se describe en la presente y también una región carboxi terminal como se describe en la presente. La molécula de TFPI de longitud completa puede ser una molécula de TFPI que existe naturalmente tal como un polipéptido de TFPI de longitud completa como se expresa a partir de un gen de TFPI, o como es secretado por células que expresan TFPI. La molécula de TFPI de longitud completa puede ser una molécula de TFPI que existe naturalmente como se encuentra en circulación en forma libre en el plasma o unido a células tales como células endoteliales. La molécula de TFPI de longitud completa no es una molécula de TFPI truncada tal como una molécula de TFPI truncada que existe naturalmente como se describe en la presente.

[0036] En una modalidad, la molécula objetivo es una molécula de TFPI truncada. Por ejemplo, la molécula de TFPI truncada puede comprender una truncación carboxi terminal. Por ejemplo, un número de formas truncadas de TFPI que existen naturalmente son conocidas. Estas pueden comprender una truncación de parte o toda la parte carboxi terminal de TFPI. Además pueden comprender truncación de parte o todo uno o más de los dominios de Kunitz. Por ejemplo, una forma truncada de TFPI puede comprender la delección de la parte carboxi terminal y parte, o todo, del tercer dominio de Kunitz.

[0037] Por ejemplo, una forma truncada de TFPI que existe naturalmente comprende únicamente los aminoácidos 1 a 161 de la molécula de TFPI de longitud completa (referida aquí como TFPI (1-161)). TFPI (1-161) es una forma activa de TFPI que tiene actividad reducida comparada con la molécula de longitud completa. TFPI (1-161) difiere en estructura de TFPI de longitud completa y anticuerpos generados contra TFPI (1-161) como una molécula objetivo por lo tanto puede diferir de anticuerpos generados contra TFPI de longitud completa.

[0038] Una forma truncada de TFPI puede ser una molécula objetivo apropiada donde se desea dirigir anticuerpos contra la región de TFPI de longitud completa que está presente en TFPI (1-161). Sin embargo, el TFPI truncado preferiblemente se usa como una molécula objetivo cuando se desea que los anticuerpos sean dirigidos contra formas truncadas específicas de TFPI tal como TFPI truncado que existe naturalmente.

[0039] En una modalidad la molécula objetivo es una forma de TFPI que existe naturalmente. Esta se puede usar en una forma en la cual está presente *in vivo*. Por ejemplo, la molécula objetivo puede ser un TFPI que existe naturalmente de longitud completa como se describió antes. La molécula objetivo puede ser un TFPI truncado que existe naturalmente como se describió antes. La molécula objetivo puede ser TFPI en una forma en la cual está presente en plasma *in vivo*. La molécula objetivo puede ser TFPI que se une a lipoproteína en la misma forma que está presente en plasma *in vivo*. La molécula objetivo puede ser TFPI que se une a células en la misma forma que ocurre *in vivo*, tal como TFPI que se une a células endoteliales. Un anticuerpo de la invención se puede unir a cualquiera o más de estas formas de TFPI que existen naturalmente. El anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a todas estas formas de TFPI que existen naturalmente, o puede ser capaz de discriminar entre estas formas diferentes, al unirse a algunas pero no a otras.

[0040] En una modalidad, la molécula objetivo es, o comprende, el segundo dominio de Kunitz de TFPI. La molécula objetivo puede comprender los aminoácidos 97 a 147 de SEC ID n.º: 1 o los aminoácidos 91 a 150 de SEC ID n.º: 1 o una región de dominio de Kunitz 2 equivalente de otro polipéptido TFPI. La molécula objetivo puede comprender SEC ID n.º: 2 o los aminoácidos 3 a 58 o 10 a 50 de SEC ID n.º: 2. La molécula objetivo puede ser, o puede comprender, un fragmento del segundo dominio de Kunitz de TFPI. Por ejemplo, la molécula objetivo puede comprender cinco o más, ocho o más, diez o más, doce o más o quince o más aminoácidos del segundo dominio de Kunitz.

[0041] La molécula objetivo puede comprender cinco o más, ocho o más, diez o más, doce o más o quince o más residuos accesibles a la superficie de TFPI o de una región particular de TFPI tal como un dominio de Kunitz particular o la parte C terminal de TFPI. Un residuo accesible a la superficie es un residuo que tiene más de 40% de accesibilidad relativa. Por ejemplo, para el dominio de Kunitz 2 de TFPI (SEC ID n.º: 1), los siguientes aminoácidos tienen más de 40% de accesibilidad relativa: 94-95, 98, 100-110, 118-121, 123-124, 131, 134, 138-142 y 144-145 (véase figura 5). La molécula objetivo puede comprender cinco o más, ocho o más, diez o más, doce o más o quince o más de estos residuos, tal como un fragmento de TFPI que incluye cinco o más, ocho o más, diez o más, doce o más o quince o más de estos residuos.

[0042] La molécula objetivo puede comprender un epítipo de TFPI conocido.

[0043] El término "epítipo", como se usa en la presente, se define en el contexto de una interacción molecular entre un "polipéptido de unión a antígeno" (Ab) y su "antígeno" (Ag) correspondiente. Como se usa en la presente, el término Ab comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo, que específicamente se une al Ag correspondiente. Ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)S, Fv (típicamente los dominios de VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo), Fv de cadena sencilla (scFv; véase, p. ej., Bird et al., Science 1988; 242:42S-426; y Huston et al. PNAS 1988; 85: 5879-5883), fragmentos dsFv, Fd (típicamente el dominio de VH y CHI), y dAb (típicamente un dominio de VH); dominios VH, VL, VhH, y V-NAR; moléculas monovalentes que comprenden una cadena sencilla de VH y una cadena sencilla de VL; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (véase, p. ej., Ill et al. Protein Eng 1997; 10:949-57); IgG de camello; IgNAR; así como una o más CDRs aisladas o un parátipo funcional, donde las CDRs aisladas o residuos o polipéptidos de unión a antígeno pueden ser asociados o enlazados entre sí para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Varios tipos de fragmentos de anticuerpo se han descrito o revisado en, p. ej., Holliger y Hudson, Nat Biotechnol 2005; 2S:1126-1136; WO2005040219, y solicitudes de patente de E.U.A. publicadas 20050238646 y 20020161201.

[0044] Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener usando técnicas recombinantes convencionales o de proteína recombinantes, y los fragmentos se pueden determinar selectivamente para unión a antígeno u otra función de la misma manera que pueden ser los anticuerpos intactos.

[0045] El término antígeno (Ag) se refiere a la entidad molecular usada para inmunización de un vertebrado inmunocompetente para producir el anticuerpo (Ab) que reconoce el Ag. Aquí, Ag se denomina más ampliamente y generalmente se pretende que incluya moléculas objetivo que son específicamente reconocidas por el Ab, por lo tanto incluye fragmentos o simulaciones de la molécula usada en el proceso de inmunización para producir el Ab. Por lo tanto, para unión de Ab al segundo dominio de kunitz (K2) de TFPI, ambos K2 aislado, TFPI de longitud completa que incluye variantes de TFPI truncadas y otras variantes de TFPI se refieren como un Ag.

[0046] Generalmente, el término "epítipo" se refiere al área o región en un Ag al cual se une específicamente un Ab, es decir, el área o región en contacto físico con el Ab. Un epítipo de proteína puede comprender residuos de aminoácidos en el Ag que están directamente implicados en la unión a un Ab (también llamado el componente inmunodominante del epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como residuos de aminoácidos del Ag que son efectivamente bloqueados por el Ab (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la "superficie excluida en solvente" y/o la "huella" del Ab). El término epítipo de la presente incluye ambos

- tipos de unión en cualquier región particular de K2 en TFPI que se une específicamente a un anticuerpo anti-TFPI, u otro agente específico de K2 de conformidad con la invención, a menos que se indique de otra manera (p. ej., en algunos contextos la invención se refiere a anticuerpos que se unen directamente a residuos de aminoácidos particulares). K2 puede comprender un número de diferentes epítomos, que pueden incluir, sin limitación, (1) determinantes antigénicos de péptido lineal, (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos localizados cerca unos de otros en la conformación de K2 madura; y (3) determinantes antigénicos post-traduccionales que consisten, ya sea en su totalidad o en parte, de estructuras moleculares unidas covalentemente a K2, tales como grupos de carbohidratos.
- [0047] El epítomo para un par de anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) dado se puede definir y caracterizar a diferentes niveles de detalle mediante el uso de una variedad de métodos de mapeo de epítomo experimentales y computacionales. Los métodos experimentales incluyen mutagénesis, cristalografía de rayos X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), espectrometría de masa de intercambio de deuterio hidrogenado (HX-MS) y varios métodos de unión de competencia. Puesto que cada método se basa en un principio único, la descripción de un epítomo está íntimamente ligada al método por el cual se ha determinado. Por lo tanto, el epítomo para un par de Ab/Ag dado se definirá de manera diferente según el método de mapeo de epítomo utilizado.
- [0048] A su nivel más detallado, el epítomo para la interacción entre el Ag y el Ab se puede definir por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción Ag-Ab, así como información acerca de sus contribuciones relativas a la termodinámica de unión. A un nivel menos detallado, el epítomo puede ser caracterizado por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos entre el Ag y Ab. A un nivel menos detallado adicional, el epítomo se puede caracterizar mediante los residuos de aminoácidos que comprende como se define por un criterio específico, p. ej., distancia entre átomos en el Ab y el Ag. A un nivel adicional menos detallado, el epítomo se puede caracterizar a través de la función, p. ej., por unión de competencia con otros Abs. El epítomo también se puede definir más genéricamente como aquel que comprende residuos de aminoácidos para los cuales la sustitución por otro aminoácido alterará las características de la interacción entre el Ab y Ag.
- [0049] En el contexto de una estructura de cristal derivada de rayos X definida por coordenadas especiales de un complejo entre un Ab, p. ej., un fragmento Fab, y su Ag, el término epítomo es en la presente, a menos que sea especificado o contradicho de otra manera por el contexto, específicamente definido como residuos de K2 caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å de un átomo pesado en el Ab.
- [0050] A partir del hecho de que las descripciones y definiciones de epítomos, dependientes del método de mapeo de epítomo usado, se obtienen a diferentes niveles de detalle, se desprende que la comparación de epítomos para diferentes Abs en el mismo Ag pueden ser conducidos de manera similar a diferentes niveles de detalle.
- [0051] Los epítomos descritos al nivel de aminoácido, p. ej., determinados a partir de una estructura de rayos X, se dice que son idénticos si contienen el mismo conjunto de residuos de aminoácidos. Se dice que los epítomos se solapan si por lo menos un aminoácido es compartido por los epítomos. Se dice que los epítomos son separados (únicos) si ningún residuo de aminoácido es compartido por los epítomos.
- [0052] Se dice que los epítomos caracterizados por unión de competencia se solapan si la unión de los Abs correspondientes es mutuamente exclusiva, es decir, la unión de un Ab excluye la unión simultánea del otro Ab. Se dice que los epítomos son separados (únicos) si el Ag es capaz de acomodar la unión de ambos Abs correspondientes en forma simultánea.
- [0053] La definición del término "parátomo" se deriva de la definición anterior de "epítomo" al revertir la perspectiva. Por lo tanto, el término "parátomo" se refiere al área o región en el Ab a la cual un Ag se une específicamente, es decir, a la cual hace contacto físico al Ag.
- [0054] En el contexto de una estructura de cristal derivada de rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un Ab, p. ej., un fragmento Fab, y su Ag, el término parátomo es en la presente, a menos que se especifique lo contrario o sea contradicho por el contexto, específicamente definido como residuos de Ag caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å de un átomo pesado en K2.
- [0055] El epítomo y parátomo para un par anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) dado puede ser identificado por métodos de rutina. Por ejemplo, la localización general de un epítomo puede ser determinada al evaluar la capacidad de un anticuerpo para unirse a diferentes fragmentos o polipéptidos de TFPI variantes. Los aminoácidos específicos dentro del TFPI que hacen contacto con un anticuerpo (epítomo) y los aminoácidos específicos en un anticuerpo que hace contacto con TFPI (parátomo) también se pueden determinar mediante el uso de métodos de rutina, tales como aquellos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo y molécula objetivo se pueden combinar y el complejo Ab/Ag se puede cristalizar. La estructura del complejo se puede determinar y usar para identificar sitios específicos de interacción entre el anticuerpo y su objetivo.

[0056] Los inventores de la presente han llevado a cabo un análisis para la interacción entre el anticuerpo MuTFPI4F36 de ratón, así como el anticuerpo HzTFPI4F36 humanizado, descrito en la presente, y el dominio de Kunitz 2 (K2) de TFPI. Este análisis se describe con más detalle en los ejemplos.

5 [0057] El parátipo de un anticuerpo de conformidad con la presente invención puede definirse como sigue: la cadena ligera de ese anticuerpo comprende residuos E31, S32, D33, Y37, A96, T97 y F99 de SEC ID n.º: 15 y la cadena pesada de ese anticuerpo comprende residuos N31, S52, R53, S54, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 y D106 de SEC ID n.º 18.

10 [0058] La cadena ligera del anticuerpo de conformidad con la presente invención por lo tanto puede comprender residuos de aminoácidos:

- E, en la posición correspondiente a la posición 31,
- S, en la posición correspondiente a la posición 32,
- 15 • D, en la posición correspondiente a la posición 33,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 37,
- A, en la posición correspondiente a la posición 96,
- T, en la posición correspondiente a la posición 97 y
- F, en la posición correspondiente a la posición 99

20 de SEC ID n.º: 15;

y la cadena pesada de ese anticuerpo puede comprender residuos de aminoácidos:

- 25 • N, en la posición correspondiente a la posición 31,
- R, en la posición correspondiente a la posición 53,
- S, en la posición correspondiente a la posición 54,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 57,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 59,
- 30 • F, en la posición correspondiente a la posición 60,
- P, en la posición correspondiente a la posición 61,
- D, en la posición correspondiente a la posición 62,
- Q, en la posición correspondiente a la posición 65,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 102,
- 35 • D, en la posición correspondiente a la posición 103 y
- D, en la posición correspondiente a la posición 106

de SEC ID n.º 18.

40 [0059] La cadena pesada además puede comprender una S en la posición correspondiente a la posición 52 de SEC ID n.º: 18.

[0060] La cadena ligera de un anticuerpo de conformidad con la presente invención además puede comprender una H en la posición correspondiente a la posición 98 de SEC ID n.º: 15 y la cadena pesada además puede comprender una S, en la posición correspondiente a la posición 56 de SEC ID n.º: 18.

[0061] Para MuTFPI4F36 (ejemplo 4) el epítipo como se encontró que está compuesto de aminoácidos E100, E101, P103, R107, Y109, T111, Y113, Q118, Q121, E123, R124, F125, K126 y L140 de SEC ID n.º: 1, correspondiente a los aminoácidos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2. Se encontró que el parátipo está compuesto de cadena ligera residuos de aminoácidos E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 y F99 de SEC ID n.º: 4 y la cadena pesada residuos de aminoácidos N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 y D106 de SEC ID n.º 8.

[0062] Para HzTFPI4F36 (ejemplo 5) el epítipo como se encontró que está compuesto de aminoácidos E100, E101, D102, P103, R107, Y109, T111, Y113, F114, N116, Q118, Q121, C122, E123, R124, F125, K126 y L140 de SEC ID n.º: 1, correspondiente a los aminoácidos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2. El parátipo como se encontró que está compuesto de cadena ligera residuos de aminoácidos E31, S32, D33, Y37, A96, T97 y F99 de SEC ID n.º: 15 y la cadena pesada residuos de aminoácidos N31, S52, R53, S54, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 y D106 de SEC ID n.º 18.

[0063] Un anticuerpo de conformidad con la presente invención se puede unir al mismo epítipo o dominio de TFPI que los anticuerpos de la invención que se describen específicamente en la presente. Por ejemplo, otros anticuerpos de la invención aún no identificados se pueden identificar al comparar su unión a TFPI con la de los anticuerpos monoclonales, MuTFPI4F36 y/o HzTFPI4F36; o al comparar la función de los anticuerpos aún no identificados con los de MuTFPI4F36 y/o HzTFPI4F36. Los análisis y pruebas que se pueden usar para el propósito de la identificación incluyen pruebas de neutralización de TFPI tales como: la prueba de inhibición de FXa descrita en el ejemplo 6 y la

prueba de inhibición de FVIIa/TF/FXa descrita en el ejemplo 7; análisis de interacción de unión tales como el análisis de resonancia de plasmón de superficie descrito en el ejemplo 8; pruebas celulares tal como la neutralización de TFPI en células endoteliales vesiculares umbilicales humanas (HUVECs), descritas en el ejemplo 9, y la neutralización de inhibición por TFPI de actividad de TF/FVIIa en células de carcinoma de mama humano MDA-MB 231, descritas en el ejemplo 10.

[0064] En una modalidad, un anticuerpo de la invención se puede unir al mismo epítipo o región que los anticuerpos MuTFPI4F36 o HzTFPI4F36 descritos aquí. La unión de MuTFPI4F36 y HzTFPI4F36 a TFPI se describe con más detalle aquí. Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo que se une al mismo epítipo en TFPI que los anticuerpos MuTFPI4F36 o HzTFPI4F36. Esto puede incluir que esté en contacto con los aminoácidos de TFPI particulares como se describió antes. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede unir a TFPI de tal manera que esté en contacto con los aminoácidos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2, o de tal manera que esté en contacto con los aminoácidos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2. Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste de E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, F35, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2.

[0065] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo E10 de SEC ID n.º: 2.

[0066] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo E11 de SEC ID n.º: 2).

[0067] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo D12 de SEC ID n.º: 2.

[0068] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo P13 de SEC ID n.º: 2.

[0069] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo R17 de SEC ID n.º: 2.

[0070] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo Y19 de SEC ID n.º: 2.

[0071] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo T21 de SEC ID n.º: 2.

[0072] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo Y23 de SEC ID n.º: 2.

[0073] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo F24 de SEC ID n.º: 2.

[0074] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo N26 de SEC ID n.º: 2.

[0075] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo Q28 de SEC ID n.º: 2.

[0076] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo Q31 de SEC ID n.º: 2.

[0077] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo C32 de SEC ID n.º: 2.

[0078] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo E33 de SEC ID n.º: 2.

[0080] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo R34 de SEC ID n.º: 2.

[0081] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo F35 de SEC ID n.º: 2.

[0082] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo K36 de SEC ID n.º: 2.

[0083] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuo L50 de SEC ID n.º: 2.

5 [0084] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2.

[0085] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse a un epítipo que comprende el residuos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2.

10

[0086] Un anticuerpo de la invención puede tener la capacidad de competir con otro anticuerpo de la invención para unirse a TFPI u otro objetivo apropiado como se describe en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede competir en forma cruzada con los anticuerpos MuTFPI4F36 o HzTFPI4F36 descritos aquí para unirse a TFPI, o a un fragmento o variante de TFPI adecuado que es unido por los anticuerpos MuTFPI4F36 o HzTFPI4F36. Esos anticuerpos de competencia cruzada pueden ser identificados en base a su capacidad para competir en forma cruzada con un anticuerpo conocido de la invención en pruebas de unión estándares. Por ejemplo, SPR p. ej., al usar un sistema Biacore™, pruebas de ELISA o citometría de flujo se pueden usar para demostrar competencia cruzada. Esa competencia cruzada puede sugerir que los dos anticuerpos se unen a epítopos idénticos, solapables o similares.

15

20

[0087] Por lo tanto, el anticuerpo de la invención puede ser capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que cualquiera o más de los siguientes anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles: mAb0281 (Ab systems) y/o mAb4904 (American Diagnostica) y/o mAb2974 (R&D systems) y/o mAb29741 (R&D systems).

25

[0088] Un anticuerpo de la invención por lo tanto puede ser identificado por un método que comprende una prueba de unión que evalúa si un anticuerpo de prueba es o no capaz de competir con un anticuerpo conocido de la invención por un sitio de unión en la molécula objetivo. Los métodos para llevar a cabo pruebas de unión competitiva son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo pueden implicar la unión de un anticuerpo conocido de la invención a una molécula objetivo mediante el uso de condiciones bajo las cuales el anticuerpo se puede unir a la molécula objetivo. El complejo anticuerpo/objetivo entonces puede ser expuesto a un anticuerpo de prueba y el grado al cual el anticuerpo de prueba es capaz de desplazar al anticuerpo de la invención de los complejos anticuerpo/objetivo puede ser evaluado. Un método alternativo puede implicar poner en contacto un anticuerpo de prueba con una molécula objetivo bajo condiciones que permiten unión del anticuerpo, después añadir un anticuerpo de la invención que es capaz de unirse a esa molécula objetivo y evaluar el grado al cual el anticuerpo de la invención es capaz de desplazar el anticuerpo de prueba de complejos anticuerpo/objetivo.

30

35

[0089] La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de un anticuerpo de la invención al objetivo demuestra que el compuesto de prueba puede competir con un anticuerpo de la invención para unirse al objetivo y por lo tanto que el anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo o región en la proteína de TFPI como el anticuerpo conocido de la invención. Un anticuerpo de prueba que es identificado como que compite con un anticuerpo conocido de la invención en el un método es también un anticuerpo potencial conforme con la presente invención. El hecho de que el anticuerpo de prueba se pueda unir a TFPI en la misma región que un anticuerpo conocido de la invención y competir con el anticuerpo conocido de la invención sugiere que el anticuerpo de prueba puede actuar como un ligando en el mismo sitio de unión que el anticuerpo conocido y que el anticuerpo de prueba por lo tanto puede simular la acción del anticuerpo conocido. Esto puede ser confirmado al evaluar la actividad de TFPI en presencia del compuesto de prueba como se describe en la presente.

40

45

[0090] El anticuerpo conocido de la invención puede ser un anticuerpo como se describe en la presente, tal como el TFPI-4F36A1B2 de ratón (también referido como anticuerpo 4F36 y anticuerpo como MuTFPI4F36), o cualquier variante o fragmento del mismo como se describe en la presente que retiene la capacidad para unirse a TFPI, tal como anticuerpos TFPI-4F36A1B2 humanizados, uno de los cuales es referido aquí como HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021). Un anticuerpo de la invención se puede unir al mismo epítipo que el anticuerpo MuTFPI4F36 como se describe en la presente o cualquier variante o fragmento del mismo como se describe en la presente que retiene la capacidad para unirse a TFPI, tal como HzTFPI4F36.

50

55

[0091] Un anticuerpo de la invención se puede unir a un epítipo que es idéntico a, se solapa, o es similar al epítipo MuTFPI4F36 que se describe además en los ejemplos. Un anticuerpo de la invención se puede unir a un epítipo que es idéntico a, traslapa o es similar al epítipo HzTFPI4F36 que se describe además en los ejemplos. Un anticuerpo de la invención se puede unir, preferiblemente específicamente, a uno o más residuos de aminoácidos que pertenecen a epítopos de MuTFPI4F36 y/o HzTFPI4F36. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede unir a cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más o diez o más de los residuos de aminoácidos expuestos anteriormente para unión de MuTFPI4F36 o HzTFPI4F36. Por ejemplo, cuando se pone en contacto con un polipéptido de SEC ID n.º: 2, un anticuerpo de la invención se puede unir al polipéptido y hace contacto con los aminoácidos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, F35, K36 and L50, o un subconjunto de esos aminoácidos, tal como por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17 o por lo menos 18 de esos aminoácidos.

60

65

- [0092] La unión específica puede ser evaluada con referencia a unión del anticuerpo a una molécula que no es el objetivo. Esta comparación se puede hacer al comparar la capacidad de un anticuerpo para unirse al objetivo y a otra molécula. Esta comparación se puede hacer como se describió antes en una evaluación de K_D o K_i . La otra molécula usada en esa comparación puede ser cualquier molécula que no es la molécula objetivo. Preferiblemente la otra molécula no es idéntica a la molécula objetivo. Preferiblemente la molécula objetivo no es un fragmento de la molécula objetivo.
- [0093] La K_D de un anticuerpo de la presente invención puede ser menor que 0.8 nM, tal como menor que 0.7 nM, tal como menor que 0.6 nM, tal como menor que 0.5 nM, tal como menor que 0.4 nM, tal como menor que 0.3 nM, tal como menor que 0.2 nM, tal como menor que 0.1 nM, tal como menor que 0.05 nM, tal como menor que 0.025 nM, tal como menor que 0.015 nM, tal como entre 0.015 nM y 0 nM.
- [0094] La otra molécula usada para determinar unión específica puede no estar relacionada en estructura o función con el objetivo. Por ejemplo, la otra molécula puede ser un material no relacionado o material acompañante en el ambiente.
- [0095] La otra molécula usada para determinar unión específica puede ser otra molécula implicada en la misma vía *in vivo* que la molécula objetivo. Por ejemplo, donde el objetivo es TFPI o un fragmento o variante del mismo, la otra molécula usada para comparación puede ser una proteína que forma parte de la cascada de coagulación de la sangre. Al asegurar que el anticuerpo de la invención tenga especificidad para TFPI sobre otra molécula, se puede evitar la reactividad cruzada *in vivo* no deseada.
- [0096] La otra molécula usada para comparación puede estar relacionada con la molécula objetivo. Por ejemplo, donde se desea identificar un anticuerpo que se une únicamente a un epítipo específico, la otra molécula para comparación puede ser una molécula de TFPI en la cual ese epítipo está ausente o es alterado. La otra molécula usada para comparación por lo tanto puede ser otra molécula objetivo que es diferente a la molécula objetivo unida por el anticuerpo en cuestión.
- [0097] El anticuerpo de la invención puede retener la capacidad para unirse a algunas moléculas que están relacionadas con la molécula objetivo. Por ejemplo, un TFPI humano maduro de longitud completa se puede usar como el objetivo, pero el anticuerpo también puede ser capaz de unirse a, p. ej., formas inmaduras de TFPI humano, fragmentos o formas truncadas de TFPI humano, TFPI que se une a lipoproteína o a una célula o TFPI de otras especies, tales como TFPI de otros mamíferos.
- [0098] Alternativamente, el anticuerpo de la invención puede tener especificidad por una molécula objetivo particular. Por ejemplo, se puede unir a una molécula objetivo como se describe en la presente, pero puede no unirse, o puede unirse con afinidad significativamente reducida a una molécula objetivo diferente como se describe en la presente. Por ejemplo, un TFPI humano maduro de longitud completa se puede usar como el objetivo, pero el anticuerpo que se une a ese objetivo puede ser incapaz de unirse a o puede unirse con menor afinidad a, p. ej., formas inmaduras de TFPI humano, fragmentos o formas truncadas de TFPI humano, TFPI que se une a lipoproteína o a una célula o TFPI de otra especie, tal como TFPI de otro mamífero.
- [0099] Un anticuerpo de la invención se puede unir a TFPI y al hacer eso puede inhibir una actividad de TFPI.
- [0100] Como se ha explicado anteriormente, TFPI regula descendientemente la coagulación de la sangre. Hace esto inhibiendo la actividad de FXa y al inhibir el complejo de TF-FVIIa en presencia de FXa. La actividad de TFPI que es inhibida por un anticuerpo de la invención puede ser cualquiera de estas actividades o cualquier efecto secuencia debajo de este. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede conducir a un incremento en coagulación de la sangre, un incremento en la presencia o niveles de FXa o una actividad incrementada de TF-FVIIa. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención reduce el tiempo de coagulación cuando hace contacto con (a) plasma deficiente en FVIII humano o (b) sangre entera humana.
- [0101] La medición de actividad de TFPI puede comprender evaluar la actividad del TFPI al inhibir la coagulación o reducir el tiempo de coagulación en una muestra de sangre. Por ejemplo, ese método puede comprender poner en contacto el TFPI con una muestra de sangre o un producto de sangre tal como plasma o suero que comprende factores de coagulación de la sangre bajo condiciones en las cuales debe ocurrir la coagulación, y determinar si la coagulación de la sangre es inhibida o el tiempo de coagulación es reducido por la presencia del TFPI. El nivel de coagulación de la sangre o tiempo de coagulación en la muestra entonces se puede comparar con la de una muestra equivalente en la cual un anticuerpo de prueba también está presente. Si el nivel de coagulación se incrementa o el tiempo de coagulación se reduce en la muestra de anticuerpo, esto sugiere que el anticuerpo inhibe la actividad de TFPI en la muestra.
- [0102] La coagulación de la sangre puede ser detectada al buscar la coagulación de la sangre misma, del plasma, o por una o más características de la cascada de coagulación que está hacia adelante al punto de acción de TFPI. Por ejemplo, el método puede evaluar niveles de FXa o activación de TF-FVIIa en la muestra.

- [0103] Diferentes otros métodos para evaluar coagulación de la sangre y tiempo de coagulación son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cualquier efecto de un anticuerpo sobre el tiempo de coagulación sanguínea se puede evaluar mediante el uso de un análisis de tiempo de protrombina diluida (análisis de dPT) como se describe en los ejemplos. En resumen, el plasma humano se pone en contacto con tromboplastina humana. El tiempo tomado para que el plasma coagule se mide en presencia y ausencia del anticuerpo de prueba. Un control positivo se puede usar en el análisis, tal como la adición de FVIIa (NovoSeven®) que se esperaría que redujera el tiempo de coagulación. Un anticuerpo de la invención debe ser capaz de reducir el tiempo de coagulación en ese método. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención debe ser capaz de reducir tiempo de coagulación de una manera dependiente de la dosis.
- [0104] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de inhibir TFPI en una prueba de coagulación a base de plasma, tal como un análisis de dPT, significativamente mejor que cualquiera o más de los siguientes anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles: mAb0281 (Ab systems) y/o mAb4904 (American Diagnostica) y/o mAb2974 (R&D systems) y/o mAb29741 (R&D systems).
- [0105] Se puede usar tromboelastografía para evaluar la cinética de formación de coágulo y fibrinólisis en muestras de sangre entera. La capacidad de un anticuerpo para reducir el tiempo de coagulación o para estimular la coagulación de la sangre por lo tanto puede ser evaluada de manera similar en una muestra de sangre entera al comparar el tiempo tomado para formación de coágulo en presencia y ausencia del anticuerpo.
- [0106] Los métodos para evaluar los efectos funcionales de un anticuerpo de la invención por lo tanto se pueden llevar a cabo *in vitro*. Esos métodos preferiblemente se llevan a cabo en muestras de sangre o plasma humanos. Esas muestras pueden ser sangre o plasma humanos normales o pueden ser deficientes en, o complementados con, uno o más factores implicados en coagulación de la sangre. Por ejemplo, estos métodos se pueden llevar a cabo mediante el uso de sangre entera humana normal, plasma humano normal o plasma o sangre entera deficiente en FVIII. La sangre o plasma deficiente en FVIII puede ser generada al poner en contacto una muestra de sangre o plasma adecuada con anticuerpo anti-FVIII neutralizante. Esos métodos *in vitro* pueden ser análisis de interacción de unión o análisis de neutralización de TFPI, tales como aquellos descritos en los ejemplos 6-11.
- [0107] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de inhibir TFPI asociado a plaquetas.
- [0108] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de inhibir TFPI soluble.
- [0109] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de inhibir TFPI unido a lipoproteína.
- [0110] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de inhibir TFPI unido a células, tal como TFPI que se une a células endoteliales.
- [0111] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse a TFPI de tal manera que FXa retenga su actividad en por lo menos 91%, tal como por lo menos 92%, tal como por lo menos 93%, tal como por lo menos 94%, tal como por lo menos 95%, tal como por lo menos 96%, tal como por lo menos 97%, tal como por lo menos 98%, tal como por lo menos 99%, tal como 99-100% como se mide en una prueba de inhibición de FXa.
- [0112] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de neutralizar la inhibición por TFPI del FVIIa/TF/FXa unido a membrana, cuando TFPI es saturado con el anticuerpo, en por lo menos 55%, tal como por lo menos 60%, tal como por lo menos 65%, tal como por lo menos 70%, tal como por lo menos 75%, tal como por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, tal como por lo menos 90%, tal como por lo menos 95%, tal como hasta 100%, tal como 100%, como se mide en una prueba de inhibidor de FVIIa/TF/FXa.
- [0113] Preferiblemente, un anticuerpo de la invención es capaz de reducir el tiempo de coagulación y/o estimular la coagulación de la sangre en una muestra de (a) sangre entera humana, (b) plasma humano, (c) sangre entera humana deficiente en FVIII, (d) plasma humano deficiente en FVIII, (e) sangre entera humana deficiente en FIX o (f) plasma humano deficiente en FIX.
- [0114] Los métodos para determinar la capacidad de un anticuerpo para estimular la coagulación de la sangre o reducir el tiempo de coagulación también se puede llevar a cabo *in vivo*. Por ejemplo, estudios *in vivo* se pueden llevar a cabo en conejos hemofílicos transitorios como se describe en los ejemplos. En resumen, los conejos pueden hacerse hemofílicos transitorios mediante la administración de anticuerpo anti-FVIII. El anticuerpo de prueba entonces se puede administrar y el tiempo de sangrado de la cutícula y/o el número de plaquetas se puede evaluar. Una reducción en el tiempo de sangrado de la cutícula en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo es capaz de reducir el tiempo de coagulación y estimular la coagulación de la sangre. Un anticuerpo que tiene ese efecto por lo tanto puede ser un anticuerpo de la presente invención.
- [0115] El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI de tal manera que el porcentaje de TFPI libre en un sujeto es reducido a menos de 30%, tal como menos de 29%, tal como menos de 28%, tal como menos de 27%, tal como menos de 26%, tal como menos de 25%, tal como menos de 24%, tal como menos de 23%, tal como menos de 22%, tal como menos de 21%, tal como menos de 20%, tal como menos de 19%, tal como

menos de 18%, tal como menos de 17%, tal como menos de 16%, tal como menos de 15%, tal como menos de 14%, tal como menos de 13%, tal como menos de 12%, tal como menos de 11%, tal como menos de 10%, tal como menos de 9%, tal como menos de 8%, tal como menos de 7%, tal como menos de 6%, tal como menos de 5%, tal como menos de 4%, tal como menos de 3%, tal como menos de 2%, tal como menos de 1%, tal como 0%.

[0116] Además, el anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI de tal manera que la cantidad de TFPI libre en un sujeto es reducida durante los primeros 28 días, tal como durante los primeros 27 días, tal como durante los primeros 26 días, tal como durante los primeros 25 días, tal como durante los primeros 24 días, tal como durante los primeros 23 días, tal como durante los primeros 22 días, tal como durante los primeros 21 días, tal como durante los primeros 20 días, tal como durante los primeros 19 días, tal como durante los primeros 18 días, tal como durante los primeros 17 días, tal como durante los primeros 16 días, tal como durante los primeros 15 días, tal como durante los primeros 14 días, tal como durante los primeros 13 días, tal como durante los primeros 12 días, tal como durante los primeros 11 días, tal como durante los primeros 10 días, tal como durante los primeros 9 días, tal como durante los primeros 8 días, tal como durante los primeros 7 días, tal como durante los primeros 6 días, tal como durante los primeros 5 días, tal como durante los primeros 4 días, tal como durante los primeros 3 días, tal como durante los primeros 2 días, tal como durante el primer día después de la administración del anticuerpo monoclonal al sujeto.

[0117] Un anticuerpo de la presente invención también puede conducir a disminución no significativa en los números de plaquetas. En particular, un anticuerpo de la invención puede ser capaz de reducir el tiempo de coagulación y/o estimulación de coagulación de la sangre en una muestra de (a) sangre entera humana, (b) plasma humano, (c) sangre entera humana deficiente en FVIII (d) plasma humano deficiente en FVIII, (e) sangre entera humana deficiente en FIX o (f) plasma humano deficiente en FIX, o en un animal *in vivo*, sin conducir a ninguna disminución significativa en los números de plaquetas. Los números de plaquetas se pueden evaluar en la misma muestra o animal que los otros efectos descritos anteriormente, o se puede evaluar por separado. Por ejemplo, los números de plaquetas se pueden evaluar en una muestra de sangre tal como una muestra de sangre obtenida de un paciente o animal experimental. Los números de plaquetas se pueden evaluar después de la administración del anticuerpo a un conejo hemofílico transitorio como se describió anteriormente. Los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de reducir el tiempo de sangrado de la cutícula sin conducir a una disminución concurrente en los números de plaquetas, como se ilustra por estudios *in vivo* en conejo hemofílico transitorios. Un cambio en los números de plaquetas se puede evaluar al comparar los números de plaquetas antes y después de la administración del anticuerpo o al comparar los números de plaquetas entre una muestra o animal tratado con el anticuerpo de interés y una muestra o animal de control no tratado con ese anticuerpo. Un anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI, de tal manera que el tiempo de coagulación *in vivo* de un sujeto es reducido y el conteo de plaquetas del sujeto no es significativamente reducido. Por ejemplo, el conteo de plaquetas del sujeto puede no caer a aproximadamente 80%, tal como aproximadamente 75%, tal como aproximadamente 70%, tal como aproximadamente 65%, tal como aproximadamente 60%, tal como aproximadamente 55%, tal como aproximadamente 50%, tal como aproximadamente 45%, tal como aproximadamente 40%, tal como aproximadamente 35%, tal como aproximadamente 30%, tal como aproximadamente 25% del conteo de plaquetas original. Preferiblemente, no habrá diferencia o no habrá diferencia estadísticamente significativa en los números de plaquetas cuando se hacen las comparaciones. Es decir, el anticuerpo de la invención no habrá causado ninguna disminución en los números de plaquetas.

[0118] El término "anticuerpo", como se refiere en la presente, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas del mismo. Un anticuerpo se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) interconectadas por variable de cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera (CH). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones de VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones de marco de trabajo (FR). Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmunológico (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

[0119] El término "región determinante de complementariedad" o "región hipervariable", cuando se usa aquí, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de unión a antígeno. Las regiones determinantes de complementariedad o "CDRs" están generalmente compuestas de residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH No. 91-3242) y/o aquellos residuos de un "lazo hipervariable" (residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol 1987; 196:901-917). Típicamente, la numeración de residuos de aminoácidos en esta región es realizada por el método descrito en Kabat et al., supra. Frases tales como "posición de Kabat", "residuo de Kabat", y "de conformidad con Kabat" referido aquí como este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera. El uso del sistema numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos o

adicionales aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción a, un FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable cadena pesada puede incluir inserciones de aminoácidos (residuo 52a, 52b y 52c de conformidad con Kabat) después del residuo 52 de CDR H2 y residuos insertados (p. ej., residuos 82a, 82b y 82c, etc., de conformidad con Kabat) después del residuo de FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de residuos puede ser determinado para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

[0120] El término "región de marco de trabajo" o residuos de "FR" se refieren a aquellos residuos de aminoácidos de VH o VL que no están dentro de los CDRs, como se define en la presente.

[0121] Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En una modalidad, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humano o humanizado o una porción de unión a antígeno de cualquiera de los mismos. Para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales, el animal experimental es un mamífero adecuado tal como, pero no restringido a, una cabra, conejo, rata o ratón.

[0122] Los anticuerpos policlonales son anticuerpos que se derivan de diferentes líneas de células B. Un anticuerpo policlonal puede comprender una mezcla de diferentes moléculas de inmunoglobulina que están dirigidos contra un antígeno específico. El anticuerpo policlonal puede comprender una mezcla de diferentes moléculas de inmunoglobulina que se unen a uno o más epítomos diferentes dentro de una molécula de antígeno. Los anticuerpos policlonales pueden ser producidos por métodos de rutina tales como inmunización de un animal adecuado, con el antígeno de interés. La sangre puede ser subsecuentemente eliminada del animal y la fracción de inmunoglobulina purificada.

[0123] Los anticuerpos monoclonales son moléculas de inmunoglobulina que son idénticas unas a otras y tienen una especificidad de unión individual y afinidad para un epítipo particular. Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente invención pueden ser producidos por una variedad de técnicas, que incluyen metodología de anticuerpo monoclonal convencional, p. ej., la técnica de hibridación de células somáticas estándares de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495, o transformación viral u oncogénica de linfocitos B. El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema de ratón. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y técnicas para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidas en la técnica. Las parejas de unión (p. ej., células de mieloma de ratón) y procedimientos de fusión son también conocidos.

[0124] Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la invención, esplenocitos y/o células de nodo linfático de ratones inmunizados pueden ser aislados y fusionados a una línea de células inmortalizadas apropiada, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser determinados selectivamente para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los hibridomas que secretan anticuerpo pueden ser recolocados en placas, determinados selectivamente de nuevo, y si aún es positivo para IgG adecuada, los anticuerpos monoclonales pueden ser subclonados por lo menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables entonces pueden ser cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización.

[0125] El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno, tal como TFPI u otra proteína objetivo como se describe en la presente. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Anticuerpos de cadena sencilla tales como scFv y anticuerpos de cadena pesada tales como anticuerpos VHH y de camello también están diseñados para ser abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos pueden ser determinados selectivamente para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[0126] Un anticuerpo de la invención puede ser preparado, expresado, creado o aislado por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcrómico para los genes de inmunoglobulina de interés o un hibridoma preparado a partir de estos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedera transformada para expresar el anticuerpo de interés, p. ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpo recombinante, combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

[0127] Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto el marco de trabajo como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de

aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana {p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, no incluye anticuerpos en los cuales secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias de marco de trabajo humanas.

[0128] El anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. El anticuerpo monoclonal humano puede ser producido por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humano y un transgen de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

[0129] Los anticuerpos humanos pueden ser aislados de genotecas de secuencias construidas en selecciones de secuencias de línea germinal humana diversificadas además con diversidad de secuencia natural y sintética.

[0130] Los anticuerpos humanos pueden ser preparados por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido por transformación de los linfocitos con virus de Epstein-Barr.

[0131] El término “derivados de anticuerpo humano” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, p. ej., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

[0132] El término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene una secuencia mínima (regiones de CDR) derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados por lo tanto son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo del donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Un ejemplo de esa modificación es la introducción de una o más de las denominadas retro-mutaciones, tal como se describe en el ejemplo 2.

[0133] Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donador. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las hipervariables de lazo corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos de FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender opcionalmente por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

[0134] Los anticuerpos de la invención se pueden probar para unirse a la proteína objetivo, por ejemplo, mediante ELISA estándar o Western blotting. Una prueba de ELISA también se puede usar para determinar selectivamente hibridomas que muestran reactividad positiva con la proteína objetivo. La especificidad de unión de un anticuerpo también se puede determinar al monitorear la unión del anticuerpo a células que expresan la proteína objetivo, por ejemplo por citometría de flujo.

[0135] La especificidad de un anticuerpo de la invención para proteína objetivo puede ser además estudiada al determinar si el anticuerpo se une o no a otras proteínas. Por ejemplo, donde se desea producir un anticuerpo que se une específicamente TFPI o una parte particular, p. ej., epítipo, de TFPI, la especificidad del anticuerpo puede ser evaluada al determinar si el anticuerpo también se une o no a otras moléculas o formas modificadas de TFPI que carecen de la parte de interés.

[0136] Como se explicó anteriormente, anticuerpos de la invención pueden modificar la actividad de TFPI. Los anticuerpos que tienen las propiedades de unión requeridas por lo tanto se pueden probar para determinar sus efectos sobre la actividad de TFPI. Por lo tanto, se pueden usar métodos para identificar anticuerpos adecuados que son capaces de unirse a TFPI y que son capaces de modificar, y en particular reducir, su actividad.

[0137] Una vez que un anticuerpo adecuado ha sido identificado y seleccionado, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede ser identificada por métodos conocidos en la técnica. Los genes que codifican el anticuerpo pueden ser clonados mediante el uso de cebadores específicos y/o degenerados. El anticuerpo puede ser recombinantemente producidos por métodos de rutina.

[0138] Un “polipéptido” se usa en la presente en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos de subunidad, análogos de aminoácido, u otros peptidomiméticos. El término “polipéptido” por lo tanto incluye secuencias de péptido corto y también polipéptidos más largos y proteínas. Como se usa en la presente, el término “aminoácido” se puede referir a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, isómeros ópticos D y/o L, y análogos de aminoácido y peptidomiméticos.

[0139] Los inventores de la presente han identificado un anticuerpo de ratón como se describe en los ejemplos. Este anticuerpo se refiere aquí como TFPI-4F36A1B2 (alternativamente, 4F36 o MuTFPI4F36). La presente invención abarca

este anticuerpo, variantes y fragmentos de los mismos – que incluyen anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados – que retienen una o más actividades del anticuerpo de ratón y que también se describen en los ejemplos. Las actividades de este anticuerpo incluyen la capacidad para unirse a TFPI, la capacidad para unirse a lugares específicos en la molécula de TFPI y la capacidad para inhibir la actividad de TFPI.

[140] Un fragmento o variante adecuada de este anticuerpo retendrá la capacidad para unirse a TFPI. Preferiblemente retendrá la capacidad para unirse específicamente a TFPI. Preferiblemente retendrá la capacidad para unirse específicamente al mismo o similar epítipo o región de la molécula de TFPI como el anticuerpo (MuTFPI4F36) del cual se deriva. Preferiblemente retendrá una o más funciones adicionales del anticuerpo del cual se deriva, tal como la capacidad para inhibir la actividad de TFPI o la capacidad para reducir el tiempo de coagulación, opcionalmente sin conducir a una caída en los números de plaquetas.

[0141] Polipéptido o “fragmentos” de anticuerpo de conformidad con la invención puede ser hecho por truncación, p. ej., por eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos N y/o C-terminal de un polipéptido. Hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40 o más aminoácidos pueden ser eliminados del N y/o C-terminal de esta manera. Los fragmentos también pueden ser generados por una o más delecciones internas.

[0142] Un anticuerpo de la invención puede ser, o puede comprender, un fragmento del anticuerpo MuTFPI4F36 o una variante de este. El anticuerpo de la invención puede ser o puede comprender una porción de unión a antígeno de este anticuerpo o una variante de este como se describió anteriormente. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento Fab de este anticuerpo o una variante de este o puede ser un anticuerpo de cadena sencilla derivado de este anticuerpo o una variante del mismo.

[0143] Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo MuTFPI4F36 se dan en SEC ID n.ºs: 6 y 10 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para las cadenas VL y VH del anticuerpo MuTFPI4F36 se dan en SEC ID n.ºs: 4 y 8 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humanizado, H₂TFPI4F36, se dan en SEC ID n.ºs: 21 y 24, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para las cadenas VL y VH de H₂TFPI4F36 se dan en SEC ID n.ºs: 15 y 18, respectivamente.

[0144] Un anticuerpo de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de MuTFPI4F36 mostrada en SEC ID n.º: 6 o un fragmento o variante de esta. Un anticuerpo adicionalmente o alternativamente puede comprender la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de MuTFPI4F36 mostrada en SEC ID n.º: 10 o un fragmento o variante del mismo como se describe en la presente.

[0145] Un anticuerpo de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de VL de SEC ID n.º: 4, o un fragmento o variante de la misma. Un anticuerpo de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de VH de SEC ID n.º: 8, o un fragmento o variante de esta. Un anticuerpo de la invención puede comprender (a) la secuencia de aminoácidos de VL de SEC ID n.º: 4, o un fragmento o variante de esta y (b) la secuencia de aminoácidos de VH de SEC ID n.º: 8, o un fragmento o variante de esta.

[0146] Un anticuerpo de la invención puede comprender un fragmento de una de las secuencias de aminoácidos de VL o VH mostrada en las figuras 2A-2B. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender un fragmento de por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 12, por lo menos 15, por lo menos 18, por lo menos 20 o por lo menos 25 aminoácidos consecutivos de SEC ID n.º: 4 o 8. Ese fragmento preferiblemente retendrá una o más de las funciones descritas anteriormente, tales como la capacidad para unirse a TFPI.

[0147] Un fragmento o variante adecuada de cualquiera de estas secuencias de VH o VL retendrán la capacidad para unirse a TFPI. Preferiblemente retendrá la capacidad para unirse específicamente a TFPI. Preferiblemente retendrá la capacidad para unirse específicamente al mismo o similar epítipo o región de la molécula de TFPI que el anticuerpo (MuTFPI4F36) del cual se deriva. Preferiblemente retendrá una o más funciones adicionales del anticuerpo del cual se deriva, tales como la capacidad para inhibir la actividad de TFPI o la capacidad para reducir el tiempo de coagulación, opcionalmente sin conducir a una caída en los números de plaquetas.

[0148] Una secuencia de VL de fragmento o variante adecuado preferiblemente retendrá los aminoácidos en las posiciones E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 y F99 en SEC ID n.º: 4. Una secuencia de VH de fragmento o variante adecuado preferiblemente retendrá los aminoácidos en las posiciones N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 y D106 en SEC ID n.º: 8. Un fragmento o variante adecuado de anticuerpo preferiblemente retendrá los aminoácidos en las posiciones E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 y F99 en SEC ID n.º: 4 y los aminoácidos en las posiciones N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 y D106 en SEC ID n.º: 8. Como se identifica en las figuras 3A-3B, éstos son los residuos en las secuencias de cadena ligera y pesada de MuTFPI4F36 que tienen un átomo pesado dentro de una distancia de 4 Å de un átomo pesado cuando MuTFPI4F36 se une al dominio de K2 de TFPI.

[0149] Un anticuerpo de la invención puede comprender una región CDR del anticuerpo específico identificado aquí tal como una región CDR dentro de SEC ID n.º: 4 o 8. Ese anticuerpo preferiblemente retendrá la capacidad para unirse a TFPI como se describe en la presente. Por ejemplo, como se muestra en las figuras 3A-3B, mediante el uso de la definición de Kabat, las secuencias de CDR dentro de la cadena ligera de MuTFPI4F36 puede ser identificada en los

- aminoácidos 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de SEC ID n.º: 4 o SEC ID n.º: 6. Las secuencias de CDR dentro de la cadena pesada de MuTFPI4F36 pueden ser identificadas en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 110 de SEC ID n.º: 8 o SEC ID n.º: 10. Un anticuerpo de la invención puede comprender una o más de las secuencias de CDR mostradas en la figura 3. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender una, dos o las tres de las secuencias de aminoácidos mostradas en los residuos 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de SEC ID n.º: 6. Un anticuerpo de la invención alternativamente o adicionalmente puede comprender una, dos o todas las tres de las secuencias de aminoácidos mostradas en los residuos 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 110 de SEC ID n.º: 10. Un anticuerpo de la invención puede comprender todas las seis secuencias de aminoácidos mostradas en los residuos 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de SEC ID n.º: 6 y 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 110 de SEC ID n.º: 10.
- [0150] Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humanizado, tal como el anticuerpo referido aquí como HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021). Ese anticuerpo puede comprender una o más regiones de CDR dentro de SEC ID n.º: 15 ó 18.
- [0151] La cadena pesada de un anticuerpo de conformidad con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos 31 a 35 de CDR1 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente.
- [0152] La cadena pesada de un anticuerpo de conformidad con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos 50 a 66 de CDR2 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.
- [0153] La cadena pesada de un anticuerpo de conformidad con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos 99 a 110 de CDR3 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.
- [0154] La cadena ligera de un anticuerpo de conformidad con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos 24 a 39 de CDR1 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- [0155] La cadena ligera de un anticuerpo de conformidad con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos 55 a 61 de CDR2 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- [0156] La cadena ligera de un anticuerpo de conformidad con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos 94 a 102 de CDR3 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- [0157] Más particularmente, un anticuerpo de la invención puede tener una cadena pesada que comprende:
- una secuencia CDR1 que, a su vez, comprende aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18; y
 - una secuencia CDR2 que, a su vez, comprende aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18; y
 - una secuencia CDR3 que, a su vez, comprende aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18.
- Un anticuerpo de la invención puede tener a cadena ligera que comprende:
- una secuencia CDR1 que, a su vez, comprende aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15; y
 - una secuencia CDR2 que, a su vez, comprende aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15; y
 - una secuencia CDR3 que, a su vez, comprende aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15.
- [0158] Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquier combinación de las regiones de CDR anteriores.
- [0159] Más particularmente, la región de marco de trabajo 2 (FR2) de la cadena pesada de un anticuerpo de la invención puede comprender aminoácidos:
- T, en la posición correspondiente a la posición 40,
 - E, en la posición correspondiente a la posición 42,
 - R, en la posición correspondiente a la posición 44 y
 - A, en la posición correspondiente a la posición 49
- de SEC ID n.º: 18.
- [0160] Alternativamente, dicho FR2 de la cadena pesada puede comprender los aminoácidos 36 a 49 de SEC ID n.º: 18.
- [0161] Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquiera de los siguientes:

- La secuencia de aminoácidos de VL de SEC ID n.º: 15.
- La secuencia de aminoácidos de VH de SEC ID n.º: 18.
- SEC ID n.ºs: 15 y 18.
- La cadena ligera secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 21.
- La cadena pesada secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 24.
- SEC ID n.ºs: 21 y 24.

[0162] Un anticuerpo de la invención alternativamente puede ser o puede comprender una variante de una de estas secuencias específicas tal como una variante del anticuerpo MuTFPI4F36 o una variante de HzTFPI4F36. Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, delección o adición de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores.

[0163] Una variante de conformidad con la presente invención puede ser un anticuerpo que no comprende:

- N, en la posición correspondiente a la posición 31

de la región CDR1 de SEC ID n.º: 18;

- R, en la posición correspondiente a la posición 53;
- S, en la posición correspondiente a la posición 54;
- S, en la posición correspondiente a la posición 56;
- Y, en la posición correspondiente a la posición 57;
- Y, en la posición correspondiente a la posición 59;
- F, en la posición correspondiente a la posición 60;
- P, en la posición correspondiente a la posición 61;
- D, en la posición correspondiente a la posición 62; y
- Q, en la posición correspondiente a la posición 65;

de la región CDR2 de SEC ID n.º: 18.

- Y, en la posición correspondiente a la posición 102;
- D, en la posición correspondiente a la posición 103; y
- D, en la posición correspondiente a la posición 106;

de la región CDR3 de SEC ID n.º: 18.

- E, en la posición correspondiente a la posición 31;
- S, en la posición correspondiente a la posición 32;
- D, en la posición correspondiente a la posición 33; y
- Y, en la posición correspondiente a la posición 37;

de la región CDR1 de SEC ID n.º: 15.

- A, en la posición correspondiente a la posición 96;
- T, en la posición correspondiente a la posición 97;
- H, en la posición correspondiente a la posición 98; y
- F, en la posición correspondiente a la posición 99;

de la región CDR3 de SEC ID n.º: 15.

[0164] Una variante de anticuerpo puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30 o más sustituciones de aminoácido y/o delecciones y/o inserciones de las secuencias específicas y fragmentos descritos anteriormente. Las variantes de "delección" pueden comprender la delección de aminoácidos individuales, delección de pequeños grupos de aminoácidos tales como 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o delección de regiones de aminoácido más grandes, tal como la delección de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "inserción" pueden comprender la inserción de aminoácidos individuales, inserción de pequeños grupos de aminoácidos tales como 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o la inserción de regiones de aminoácido más grandes, tales como la inserción de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "sustitución" preferiblemente implican el reemplazo de uno o más aminoácidos con el mismo número de aminoácidos y que hacen sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, un aminoácido puede ser sustituido con un aminoácido alternativo que tiene propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrofílico, otro aminoácido hidrofóbico, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que se pueden usar para seleccionar sustituyentes adecuados son como sigue:

Ala	alifático, hidrofóbico, neutro	Met	hidrofóbico, neutro
Cys	Polar, hidrofóbico, neutro	Asn	Polar, hidrofílico, neutro
Asp	Polar, hidrofóbico, cargado (-)	Pro	hidrofóbico, neutro
Glu	polar, hidrofóbico, cargado (-)	Gln	Polar, hidrofílico, neutro
Phe	aromático, hidrofóbico, nutral	Arg	polar, hidrofílico, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	Polar, hidrofílico, neutro
His	aromático, polar, hidrofílico, cargado (+)	Thr	Polar, hidrofílico, neutro
Ile	alifático, hidrofóbico, neutro	Val	alifático, hidrofóbico, neutro
Lys	polar, hidrofílico, cargado (+)	Trp	alifático, hidrofóbico, neutro
Leu	alifático, hidrofóbico, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrofóbico

[0165] Los “derivados” o “variantes” preferidos incluyen aquellos en los cuales en lugar del aminoácido que existe naturalmente, el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural de este. Los aminoácidos usados en las secuencias también se pueden derivar o modificar, p. ej., marcar, siempre que la función del anticuerpo no sea significativamente afectada en forma adversa.

[0166] Las sustituciones pueden ser, pero no están limitadas a, sustituciones conservativas.

[0167] Derivados y variantes como se describió antes se pueden preparar durante la síntesis del anticuerpo o por modificación después de la producción, o cuando el anticuerpo está en forma recombinante mediante el uso de las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, o digestión enzimática y/o ligación de ácidos nucleicos.

[0168] En otro aspecto, la presente invención provee moléculas multiespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-TFPI, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención. Esas moléculas multiespecíficas incluyen moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para TFPI y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. Un tipo de moléculas biespecíficas son anticuerpos biespecíficos como se conoce en la técnica. Anticuerpos biespecíficos, o de hecho anticuerpos multiespecíficos, se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p. ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')₂) o cualesquiera otros fragmentos de unión a antígeno descritos aquí.

[0169] En un aspecto, la presente invención provee derivados de anticuerpo (o inmunoconjugados), tales como anticuerpos anti-TFPI conjugados o covalentemente unidos a un segundo agente. El segundo agente puede ser enlazado al anticuerpo directamente o indirectamente, mediante el uso de cualquiera de un gran número de métodos disponibles conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, un agente puede ser unido a la región de gozne del componente de anticuerpo reducido mediante la formación del enlace de disulfuro, mediante el uso de entrelazadores tales como N- S-(2-piridilditio)propionato de succinilo (SPDP), o mediante una porción carbohidrato en la región Fc del anticuerpo.

[0170] En un aspecto, los anticuerpos de la invención pueden ser manipulados genéticamente para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en el suero, fijación de complemento, unión a receptor de Fc, estabilidad de proteína y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno, o carecer de los mismos. Además, un anticuerpo de la invención puede ser químicamente modificado (p. ej., una o más porciones químicas pueden ser unidas al anticuerpo) o pueden ser modificadas para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

[0171] Si se desea, la clase de un anticuerpo puede ser “cambiada” por técnicas conocidas. Por ejemplo, un anticuerpo que era originalmente producido como una molécula de IgM puede ser clase cambiada a un anticuerpo de IgG. Las técnicas de cambio de clase también se pueden usar para convertir una subclase de IgG a otra, por ejemplo: de IgG1 a IgG2 o IgG4; de IgG2 a IgG1 o IgG4; o de IgG4 a IgG1 o IgG2. La manipulación genética de anticuerpos para generar moléculas quiméricas de región constante, por combinación de regiones de diferentes subclases de IgG, también se puede realizar.

[0172] En una modalidad, la región de gozne de CHI es modificada de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región de gozne es alterado, p. ej., incrementada o disminuida. Este enfoque se describe además por ejemplo en la patente de E.U.A. No. 5,677,425 de Bodmer et al.

[0173] La región constante además puede ser modificada para estabilizar el anticuerpo, p. ej., para reducir el riesgo de un anticuerpo bivalente al separar en dos fragmentos de VH-VL monovalentes. Por ejemplo, en una región constante de IgG4, el residuo S241 puede ser mutado a un residuo de prolina (P) para permitir la formación de puente de disulfuro completo en el gozne (véase, p. ej., Angal et al., Mol Immunol. 199S; 30: 105-8).

[0174] Anticuerpos variantes de conformidad con la invención puede tener secuencias de aminoácidos que sea más de

- 60%, o más de 65%, o más de 70%, o más de 75%, o más de 80%, preferiblemente más de 85%, tal como más de 90%, tal como más de 95% idénticos a SEC ID n.ºs: 4 o 8, o fragmentos de los mismos. Otros anticuerpos de variante de conformidad con la invención pueden tener secuencias de aminoácidos que sean más de 60%, o más de 65%, o más de 70%, o más de 75%, o más de 80%, preferiblemente más de 85%, tal como más de 90%, tal como más de 95% idénticos a SEC ID n.ºs: 15 o 18, o un fragmento del mismo. Este nivel de identidad de aminoácido se puede ver a través de la longitud completa de la secuencia de SEC ID n.º relevante o sobre una parte de la secuencia, tal como a través de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200 o más aminoácidos, según el tamaño del polipéptido de longitud completa.
- [0175] En conexión con las secuencias de aminoácidos, "identidad de secuencia" se refiere a secuencias que tienen el valor establecido cuando se evalúa mediante el uso de ClustalW (Thompson et al., 1994, supra) con los siguientes parámetros:
- [0176] Parámetros de alineación por pares - Método: exacto, Matriz: PAM, Sanción por espacio abierto: 10.00, sanción por extensión de espacio: 0.10;
- [0177] Parámetros de alineación múltiple -Matriz: PAM, Sanción por espacio abierto: 10.00, % de identidad por retraso: 30, Sanción por espacios abiertos: no, distancia de separación de espacio: 0, matriz negativa: no, sanción por extensión de espacio: 0.20, sanciones por espacio específica de residuo: no, sanciones por espacio hidrofílico: no, Residuos hidrofílicos: GPSNDQEKR. Identidad de secuencia en un residuo particular está diseñada para incluir residuos idénticos que simplemente han sido derivados.
- [0178] La presente invención por lo tanto provee anticuerpos que tienen secuencias de aminoácidos de VH y VL específicos y variantes y fragmentos de los mismos que mantienen la función o actividad de estos dominios de VH y VL.
- [0179] Por consiguiente, un anticuerpo de la invención puede comprender:
- (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 4;
- (b) un fragmento de por lo menos 7 aminoácidos de (a) que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI; o
- (c) una variante de (a) que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de (a) y que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI.
- [0180] Un anticuerpo de la invención puede comprender:
- (a) a región variable de cadena pesada secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 8;
- (b) un fragmento de por lo menos 7 aminoácidos de (a) que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI; o
- (c) una variante de (a) que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de (a) y que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI.
- [0181] Un anticuerpo de la invención puede comprender la región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 4 y la región variable de cadena pesada de SEC ID n.º: 8.
- [0182] Un anticuerpo de la invención puede comprender:
- (a) la región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 4 y la región variable de cadena pesada de SEC ID n.º: 8;
- (b) una variante de (a) en la cual una o ambas de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera es modificada de tal manera que comprende un fragmento de por lo menos 7 aminoácidos de la secuencia especificada en (a); o
- (c) una variante de (a) o (b) en la cual una o ambas de las secuencias de cadena pesada y ligera es modificada de tal manera que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de (a) o (b);
- donde el anticuerpo retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI. El anticuerpo también puede retener una o más funciones o actividades adicionales de un anticuerpo de la invención como se describe en la presente, tal como la capacidad para inhibir TFPI o la capacidad para acortar el tiempo de coagulación, opcionalmente sin conducir a una caída en los números de plaquetas.
- [0183] Fragmentos y variantes preferidos de SEC ID n.º: 4 comprenderán (i) aminoácidos 24 a 39 de SEC ID n.º: 6; y/o (ii) aminoácidos 55 a 61 de SEC ID n.º: 6; y/o (iii) aminoácidos 94 a 102 de SEC ID n.º: 6. Los fragmentos y variantes preferidos de SEC ID n.º: 8 comprenderán (i) aminoácidos 31 a 35 de SEC ID n.º: 10; y/o (ii) aminoácidos 50 a 66 de SEC ID n.º: 10; y/o (iii) aminoácidos 99 a 110 de SEC ID n.º: 10.
- [0184] Variantes preferidas adicionales de SEC ID n.º: 4 comprenderán los aminoácidos 31 a 33, 37 y 96 a 99 de SEC

ID n.º: 6. Variantes preferidas adicionales de SEC ID n.º: 8 comprenderán los aminoácidos 31, 53, 54, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 65, 102, 103 y 106 de SEC ID n.º: 10.

[0185] Un anticuerpo de la invención puede comprender:

(a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 15;

(b) un fragmento de por lo menos 7 aminoácidos de (a) que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI; o

(c) una variante de (a) que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de (a) y que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI.

[0186] Un anticuerpo de la invención puede comprender:

(a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEC ID n.º: 18;

(b) un fragmento de por lo menos 7 aminoácidos de (a) que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI; o

(c) una variante de (a) que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de (a) y que retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI.

[0187] Un anticuerpo de la invención puede comprender la región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 15 y la región variable de cadena pesada de SEC ID n.º: 18.

[0188] Un anticuerpo de la invención puede comprender:

(a) la región variable de cadena ligera de SEC ID n.º: 15 y la región variable de cadena pesada de SEC ID n.º: 18;

(b) una variante de (a) en la cual una o ambas de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera es modificada de tal manera que comprende un fragmento de por lo menos 7 aminoácidos de la secuencia especificada en (a); o

(c) una variante de (a) o (b) en la cual una o ambas de las secuencias de cadena pesada y ligera es modificada de tal manera que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de (a) o (b);

donde el anticuerpo retiene la capacidad para unirse específicamente a TFPI. El anticuerpo también puede retener una o más funciones o actividades adicionales de un anticuerpo de la invención como se describe en la presente tal como la capacidad para inhibir TFPI o la capacidad para acortar el tiempo de coagulación, opcionalmente sin conducir a una caída en los números de plaquetas.

[0189] Como se explicó antes, un anticuerpo de la invención se puede unir al mismo epítipo o región que otro anticuerpo de la invención. Por lo tanto, se verá que el anticuerpo se puede unir al mismo epítipo o región de TFPI que cualquiera de los anticuerpos, fragmentos y variantes específicos descritos aquí.

[0190] La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención. Por lo tanto, un polinucleótido de la invención puede codificar cualquier anticuerpo como se describe en la presente. Los términos "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente aquí y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de gen, ARN mensajero (ARNm), ADNc, polinucleótidos recombinantes, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido de la invención se puede proveer en forma aislada o purificada.

[0191] Una secuencia de ácido nucleico que "codifica" un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que es transcrita (en el caso de ADN) y traducida (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el 5' (amino) terminal y un codón de detención de traducción en el 3' (carboxi) terminal. Para los propósitos de la invención, las secuencias de ácido nucleico pueden incluir, pero no se limitan a, ADNc de ARNm viral, procariótico o eucariótico, secuencias genómicas del ADN o ARN viral o procariótico, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de transcripción puede ser localizada 3' a la secuencia codificante.

[0192] En una modalidad, un polinucleótido de la invención comprende una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos de VH o VL como se describió antes. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que comprende la secuencia de SEC ID n.º: 4 o 8, o una variante o fragmento del mismo como se describió antes. El polinucleótido puede consistir en o comprender una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEC ID n.ºs: 3, 5, 7 y 9. Una secuencia de polinucleótido adecuada alternativamente puede ser una variante de una de estas secuencias de polinucleótido específicas. Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, delección o adición de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores. Un polinucleótido variante puede comprender 1, 2,

3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 75 o más sustituciones y/o deleciones de ácido nucleico de las secuencias dadas en el listado de secuencias.

[0193] Variantes adecuadas pueden ser por lo menos 70% homólogas a un polinucleótido de cualquiera de SEC ID n.ºs: 3, 5, 7 y 9, preferiblemente por lo menos 80 o 90% y muy preferiblemente por lo menos 95%, 97% o 99% homólogas a las mismas. Los métodos de medición de homología son bien conocidos en la técnica y serán entendidos por los expertos en la técnica en el siguiente contexto, la homología se calcula sobre la base de identidad de ácido nucleico. Esa homología puede existir sobre una región de por lo menos 15, preferiblemente por lo menos 30, por ejemplo por lo menos 50, 60, 100, 200 o más nucleótidos contiguos. Esa homología puede existir sobre la longitud entera de la secuencia de polinucleótidos no modificada.

[0194] Los métodos de medición de homología o identidad de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el paquete UWGCG provee el programa BESTFIT que se puede usar para calcular homología (p. ej., usado sobre sus valores por omisión) (Devereux et al (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395).

[0195] Los algoritmos PILEUP y BLAST también se pueden usar para calcular homología o secuencias de alineación (típicamente sobre sus valores por omisión), por ejemplo como se describe en Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) *J Mol Biol* 215:403-10.

[0196] El software para realizar análisis de BLAST está públicamente disponible a través del National Centre for Biotechnology Information (centro nacional para información de biotecnología)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de puntuación alta (HSPs) al identificar palabras cortas de longitud W en la secuencia de preguntas que ya sea concuerda o satisface alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T es referida como el umbral de fuente de palabra vecina (Altschul et al, supra). Estos número de ocurrencias de palabra de los alrededores iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs que los contienen. Los números de ocurrencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como la puntuación de alineación acumulativa se puede incrementar. Las extensiones para los números de ocurrencias de palabra en cada dirección son detenidas cuando: la puntuación de alineación acumulativa llega a cero o menor, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativa; o el extremo de cualquier secuencia es alcanzado. Los parámetros de algoritmo de BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como omisiones una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación de BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919 alineaciones (B) de 50, expectación (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

[0197] El algoritmo de BLAST realiza un análisis estadístico sobre la similitud de dos secuencias; véase p. ej., Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787. Una medida de similitud provista por el algoritmo de BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que provee una indicación de la probabilidad por la cual una concordancia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por probabilidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación con la primera secuencia a la segunda secuencia es menor que aproximadamente 1, preferiblemente menor que aproximadamente 0.1, muy preferiblemente menor que aproximadamente 0.01, y muy preferiblemente menor que aproximadamente 0.001.

[0198] El homólogo puede diferir de una secuencia en el polinucleótido relevante por menos de 3, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (cada una de las cuales puede ser una sustitución, deleción o inserción). Esta mutación se puede medir sobre un región de por lo menos 30, por ejemplo por lo menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos del homólogo.

[0199] En una modalidad, una secuencia de variante puede variar de las secuencias específicas dadas en el estado de secuencias en virtud de la redundancia del código genético. El código de ADN tiene cuatro residuos de ácidos nucleicos primarios (A, T, C y G) y usan estos para "deletrear" codones de tres letras que representan los aminoácidos que las proteínas codifican en los genes de un organismo. La secuencia lineal de codones a lo largo de la molécula de ADN es traducida a la secuencia lineal de aminoácidos en proteína(s) codificada por esos genes. El código es altamente degenerado, con 61 codones que codifican para los 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan señales de "detención". Por lo tanto, la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón- de hecho varios son codificados por cuatro o más codones diferentes. Un polinucleótido de variante de la invención por lo tanto puede codificar la misma secuencia de polipéptido que otro polinucleótido de la invención, pero puede tener una secuencia de ácido nucleico diferente debido al uso de diferentes codones para codificar los mismos aminoácidos.

[0200] "Fragmentos" de polinucleótidos de conformidad con la invención se pueden hacer por truncación, p. ej., al eliminar uno o más nucleótidos de uno o más extremos del polinucleótido hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 75 hasta 100, hasta 200 o más aminoácidos pueden ser eliminados del extremo 3' y/o 5' del polinucleótido de esta manera. Los fragmentos también pueden ser generados por una o más deleciones internas. Estos fragmentos pueden ser derivados de una secuencia de SEC ID n.ºs: 3, 5, 7 y 9 o pueden ser derivados de un polinucleótido de variante como se describe en la presente. Preferiblemente, esos fragmentos tienen entre 30 y 300 residuos de longitud, p. ej., 30 a 300, 30 a 200, 30 a 100, 100 a 200 o 200 a 300 residuos. Alternativamente, los fragmentos de la invención pueden ser secuencias más largas, por ejemplo que comprenden por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos

70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de un polinucleótido de longitud completa de la invención.

[0201] Un anticuerpo de la invención por lo tanto puede ser producido a partir de o suministrado en forma de un polinucleótido que lo codifica, y es capaz de expresarlo. Donde el anticuerpo comprende dos o más cadenas, un polinucleótido de la invención puede codificar una o más cadenas de anticuerpo. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede codificar una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo o ambas. Dos polinucleótidos se pueden proveer, uno de los cuales codifica una cadena ligera de anticuerpo y el otro de los cuales codifica la cadena pesada de anticuerpo correspondiente. El polinucleótido o par de polinucleótidos pueden ser expresados juntos de tal manera que se genera un anticuerpo de la invención.

[0202] Los polinucleótidos de la invención pueden ser sintetizados de conformidad con métodos bien conocidos en la técnica, como se describe a manera de ejemplo en Sambrook et al (1989, molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

[0203] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden proveer en forma de un casete de expresión que incluye secuencias de control, secuencias de péptido de señal operablemente enlazadas a la secuencia insertada, por lo tanto permiten la expresión del anticuerpo de la invención *in vivo*. Estos casetes de expresión, a su vez, se proveen típicamente dentro de vectores (p. ej., plásmidos o vectores virales recombinantes). El casete de expresión se puede administrar directamente a un sujeto huésped. Alternativamente, un vector que comprende un polinucleótido de la invención puede ser administrado a un sujeto huésped. Preferiblemente, el polinucleótido se prepara y/o se administra mediante el uso de un vector genético. Un vector adecuado puede ser cualquier vector que sea capaz de portar una cantidad suficiente de información genética, y que permita la expresión de un polipéptido de la invención.

[0204] La presente invención por lo tanto incluye vectores de expresión que comprenden esas secuencias de polinucleótidos. Los vectores de expresión son construidos rutinariamente en la técnica de biología molecular y por ejemplo pueden implicar el uso de ADN de plásmido e iniciadores, promotores, incrementadores, secuencias de péptidos de señal y otros elementos, apropiados, tales como por ejemplo señales de poliadenilación que pueden ser necesarios y que están ubicados en la orientación correcta, a fin de permitir la expresión de un péptido de la invención. Otros vectores adecuados serían evidentes para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional, a este respecto los inventores de la presente refieren a Sambrook et al.

[0205] La invención también incluye células que han sido modificadas para expresar un anticuerpo de la invención. Esas células incluyen líneas de células eucarióticas más altas transitorias o preferiblemente estables, tales como células de mamíferos o células de insectos, células eucarióticas inferiores, tales como células de levadura o procarióticas tales como células bacterianas. Ejemplos particulares de células que pueden ser modificadas mediante la inserción de vectores o casetes de expresión que codifican para un anticuerpo de la invención incluyen HEK293 de mamífero, CHO, BHK, NSO y células de retina humana. Preferiblemente, la línea de células seleccionada será una que no sea sólo estable, sino que también permita la glicosilación madura y la expresión de superficie celular de un polipéptido.

[0206] Las líneas de células de la invención pueden ser cultivadas mediante el uso de métodos de rutina para producir un anticuerpo de la invención, o se pueden usar terapéuticamente o profilácticamente para suministrar anticuerpos de la invención a un sujeto. Alternativamente, los polinucleótidos, casetes o vectores de expresión de la invención se pueden administrar a una célula de un sujeto *ex vivo* y la célula después se puede regresar al cuerpo del sujeto.

[0207] En otro aspecto, la presente invención provee composiciones y formulaciones que comprenden moléculas de la invención, tales como los anticuerpos, polinucleótidos, vectores y células descritos aquí. Por ejemplo, la invención provee una composición farmacéutica que comprende una o más moléculas de la invención, tal como uno o más anticuerpos de la invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0208] Como se usa en la presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y retardadores de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración parenteral, p. ej., intravenosa, intramuscular o subcutánea (p. ej., mediante inyección o infusión). Según la vía de administración, el anticuerpo puede ser revestido en un material para proteger al anticuerpo contra la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar o desnaturalizar el anticuerpo.

[0209] Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos comprenden vehículos o diluyentes acuosos. Ejemplos de vehículos acuosos adecuados que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, agua regulada en su pH y solución salina. Ejemplos de otros vehículos incluyen etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de agentes tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

- [0210] Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de presencia de microorganismos puede ser asegurada tanto por procedimientos de esterilización, antes mencionados, como por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede llevarse a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.
- [0211] Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para concentración de fármaco alta.
- [0212] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el agente activo (p. ej., anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requieran, seguido por microfiltración mediante esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el agente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelamiento (liofilización) que producen un polvo del agente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada en forma estéril de este.
- [0213] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender ingredientes activos adicionales así como un anticuerpo de la invención. Como se mencionó antes, las composiciones de la invención pueden comprender uno o más anticuerpos de la invención. También pueden comprender agentes terapéuticos o profilácticos adicionales. Por ejemplo, donde una composición farmacéutica de la invención está diseñada para usarse en el tratamiento de un trastorno de hemorragia, adicionalmente puede comprender uno o más agentes diseñados para reducir los síntomas del trastorno de hemorragia. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más factores de coagulación. La composición puede comprender uno o más de otros componentes diseñados para mejorar la condición del paciente. Por ejemplo, donde la composición está diseñada para usarse en el tratamiento de pacientes que padecen hemorragia no deseada tales como pacientes que han sufrido cirugía o pacientes que padecen trauma, la composición puede comprender uno o más agentes analgésicos, anestésicos, inmunosupresores, o antiinflamatorios. También dentro del alcance de la presente invención están los kits que comprenden anticuerpos u otras composiciones de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un agente terapéutico o profiláctico adicional como se describió anteriormente.
- [0214] Los anticuerpos, otras moléculas y composiciones de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el tratamiento y prevención de trastornos relacionados con la coagulación. Por ejemplo, estos anticuerpos y composiciones se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, p. ej., *in vivo*, para prevenir o tratar una variedad de trastornos.
- [0215] En particular, la presente invención provee métodos para el tratamiento de trastornos de hemorragia o para el incremento de coagulación de la sangre que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un anticuerpo u otra molécula o composición de la invención. Por ejemplo, los métodos pueden ser para el tratamiento de deficiencias de factor de coagulación tales como hemofilia A, hemofilia B, deficiencia de factor XI, deficiencia de factor VII, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand. Los métodos pueden ser para el tratamiento de condiciones acompañadas por la presencia de un inhibidor de factor de coagulación. Los métodos pueden ser para el tratamiento de hemorragia excesiva. Los anticuerpos y composiciones de la invención se pueden usar para tratar pacientes antes, durante, o después de cirugía o terapia con anticoagulantes o después de trauma. Los anticuerpos y composiciones descritos aquí se pueden usar en cualquier tratamiento o se pueden usar en la fabricación de un medicamento para usarse en cualquier tratamiento.
- [0216] Los anticuerpos y composiciones de la presente invención se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.
- [0217] En aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos o composiciones se administran a un sujeto que ya padece de un trastorno o condición como se describió antes, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o parcialmente detener la condición de uno o más de sus síntomas. El tratamiento terapéutico puede dar por resultado una disminución en la severidad de los síntomas de enfermedad, o un incremento en frecuencia o duración de periodos libres de síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente efectiva". Por ejemplo, donde el tratamiento es para hemorragia no deseada, la terapia se puede definir como una disminución en la cantidad de hemorragia o coagulación adecuada para detener la hemorragia por completo.
- [0218] En aplicaciones profilácticas o preventivas, anticuerpos o composiciones se administran a un sujeto en riesgo de un trastorno o condición como se describió antes, en una cantidad suficiente para prevenir o reducir los efectos subsecuentes de la condición para uno o más de sus síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como

una “cantidad profilácticamente efectiva”. Por ejemplo, donde el tratamiento es para prevenir hemorragia no deseada, un efecto profiláctico puede ser definido como la prevención de hemorragia o un periodo reducido o cantidad reducida de hemorragia comparada con la que se vería en ausencia del modulador.

5 [0219] Cantidades efectivas para cada propósito dependerán de la severidad de la enfermedad o lesión así como el peso y estado general del sujeto.

10 [0220] Como se usa en la presente, el término “sujeto” incluye cualquier human o animal no humano. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

15 [0221] Un anticuerpo o composición de la presente invención se puede administrar por una o más vías de administración mediante el uso de una o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como lo apreciará el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variará según los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para anticuerpos o composiciones de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase “administración parenteral”, como se usa en la presente, significa modos de administración distintos de administración enteral y tópica, usualmente por inyección. Alternativamente, un anticuerpo o composición de la invención se puede administrar por vía no parenteral, tal como una vía de administración
20 tópica, epidérmica o por la mucosa.

[0222] De manera similar, un anticuerpo de la invención se puede usar para la fabricación de un medicamento adecuado para administración parenteral.

25 [0223] Un anticuerpo de la invención se puede usar para la fabricación de un medicamento adecuado para administración intravenosa.

[0224] Un anticuerpo de la invención se puede usar para la fabricación de un medicamento adecuado para administración intramuscular.

30 [0225] Un anticuerpo de la invención se puede usar para la fabricación de un medicamento adecuado para administración subcutánea.

35 [0226] Una dosis adecuada de un anticuerpo de la invención puede ser determinada por un médico experto. Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad del anticuerpo particular utilizado, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del anticuerpo, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente que es tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

45 [0227] Una dosis adecuada de un anticuerpo de la invención puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0.1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente que es tratado. Por ejemplo, una dosis adecuada puede ser de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día. Una dosis adecuada de un anticuerpo de la invención puede estar en el intervalo de 2 a 200 mg/kg, tal como aproximadamente 150-200 mg/kg, tal como aproximadamente 150-170 mg/kg, tal como aproximadamente 100-150 mg/kg, tal como aproximadamente 50-100
50 mg/kg, tal como aproximadamente 70-90 mg/kg, tal como aproximadamente 10-50 mg/kg, tal como aproximadamente 10-30 mg/kg.

[0228] Otras dosis adecuadas pueden ser aproximadamente 0.1-10 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-1 mg/kg, tal como aproximadamente 1-2 mg/kg o aproximadamente 2-3 mg/kg o aproximadamente 4-5 mg/kg o aproximadamente 5-
55 6 mg/kg o aproximadamente 6-7 mg/kg o aproximadamente 7-8 mg/kg o aproximadamente 8-9 mg/kg o aproximadamente 9-10 mg/kg; o aproximadamente 10-21 mg/kg, tal como aproximadamente 10-11 mg/kg, o aproximadamente 11-12 mg/kg, o aproximadamente 12-13 mg/kg, o aproximadamente 13-14 mg/kg, o aproximadamente 14-15 mg/kg, o aproximadamente 15-16 mg/kg, o aproximadamente 16-17 mg/kg, o aproximadamente 17-18 mg/kg, o aproximadamente 18-19 mg/kg, o aproximadamente 19-20 mg/kg o aproximadamente
60 20-21 mg/kg.

[0229] La cantidad de anticuerpo monoclonal administrado a un sujeto puede ser tal que su administración da por resultado una concentración en el plasma del sujeto de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml, tal como aproximadamente 15-35 µg/ml, tal como aproximadamente 10-15 µg/ml, tal como aproximadamente 15-20 µg/ml, tal como aproximadamente 20-25 µg/ml, tal como aproximadamente 25-30 µg/ml, tal como aproximadamente 30-35
65 µg/ml, tal como aproximadamente 35-40 µg/ml, del anticuerpo monoclonal. Los regímenes de dosis se pueden ajustar

para proveer la respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un solo bolo se puede administrar, varias dosis divididas se pueden administrar con el tiempo o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o incrementada como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosis. La forma de dosis unitaria, como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adaptadas como dosis unitarias para los sujetos que han de ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

[0230] Los anticuerpos se pueden administrar en una sola dosis o en dosis múltiples. Las dosis múltiples se pueden administrar por las mismas o diferentes vías y a los mismos o diferentes lugares. Alternativamente, los anticuerpos se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosis y frecuencia pueden variar de acuerdo con la vida media del anticuerpo en el paciente y la duración del tratamiento que se desee. La dosis y frecuencia de administración también pueden variar de acuerdo con si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosis relativamente baja se puede administrar a intervalos relativamente infrecuentes durante un período largo. En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta se puede administrar, por ejemplo hasta que el paciente muestra aminoramiento parcial o completo de síntomas de enfermedad.

[0231] Por lo tanto, un anticuerpo de la invención se puede administrar: aproximadamente cada día, aproximadamente cada dos días, aproximadamente cada tres días, aproximadamente cada cuatro días, aproximadamente cada cinco días, aproximadamente cada seis días; aproximadamente cada semana, tal como cada 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días; aproximadamente cada dos semanas, tal como cada 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 días; aproximadamente cada tres semanas, tal como cada 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 días; aproximadamente cada cuatro semanas, tal como cada 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días. Un anticuerpo de la invención también se puede administrar sobre demanda.

[0232] Como se mencionó antes, los anticuerpos de la invención se pueden co-administrar con uno o más de otros agentes terapéuticos. El otro agente puede ser un agente que incremente los efectos del modulador. El otro agente puede ser un agente que actúe para incrementar la coagulación de la sangre, tal como un factor de coagulación de la sangre. En particular, los moduladores de la invención puede ser co-administrados con Factor VII(a) o FVIII(a). El otro agente puede estar diseñado para tratar otros síntomas o condiciones del paciente. Por ejemplo, el otro agente puede ser un agente analgésico, anestésico, inmunosupresor o anti-inflamatorio.

[0233] La administración combinada de dos o más agentes se puede lograr en un número de diferentes formas. En una modalidad, el anticuerpo y el otro agente se pueden administrar juntos en una sola composición. En otra modalidad, el anticuerpo y el otro agente se pueden administrar en composiciones separadas como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, el modulador se puede administrar antes, después o concurrentemente con el otro agente.

[0234] El término "tratamiento", como se usa en la presente, se refiere a la terapia médica de cualquier sujeto humano u otro sujeto animal que necesita de este. Se espera que el sujeto haya sido sometido a examen físico por un médico o un médico veterinario, quien ha dado un diagnóstico tentativo o definitivo que indique que el uso del tratamiento específico es benéfico para la salud del sujeto humano u otro sujeto animal. El tiempo y propósito del tratamiento puede variar de un individuo a otro, de conformidad con el estado de salud del sujeto. Por lo tanto, el tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo. En términos de la presente invención, los tratamientos profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo pueden representar aspectos separados de la invención.

[0235] Por lo tanto, un anticuerpo de la invención se puede administrar por vía parenteral.

[0236] Un anticuerpo de la invención se puede administrar por vía intravenosa.

[0237] Un anticuerpo de la invención se puede administrar por vía intramuscular.

[0238] Un anticuerpo de la invención se puede administrar por vía subcutánea.

[0239] Un anticuerpo de la invención se puede administrar profilácticamente,

[0240] Un anticuerpo de la invención se puede administrar terapéuticamente (sobre demanda).

[0241] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de reducir significativamente la pérdida de sangre.

[0242] Un anticuerpo de la invención puede ser capaz de reducir significativamente el tiempo de sangrado.

[0243] Por lo tanto, la invención es también un método de tratamiento de un sujeto que necesita el mismo con un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI, donde la cantidad de anticuerpo monoclonal administrada es tal como para saturar su objetivo. La cantidad de anticuerpo monoclonal administrado puede ser tal como para saturar TFPI soluble. La cantidad de anticuerpo monoclonal administrado puede ser tal como para saturar TFPI unido al endotelio.

[0244] El término “coagulopatía”, como se usa en la presente, se refiere a una tendencia hemorrágica incrementada que puede ser causada por cualquier deficiencia cualitativa o cuantitativa de cualquier componente pro-coagulativo de la cascada de coagulación normal, o cualquier regulación ascendente de fibrinólisis. Tales coagulopatías pueden ser congénitas y/o adquiridas y/o iatrogénicas y son identificadas por un experto en la técnica.

[0245] Ejemplos no limitantes de hipocoagulopatías congénitas son hemofilia A, hemofilia B, deficiencia de Factor VII, deficiencia de Factor XI, enfermedad de von Willebrand y trombocitopenias tales como trombastenia de Glanzmann y síndrome de Bernard-Soulier.

[0246] Un ejemplo no limitante de una coagulopatía adquirida es deficiencia de serina proteasa causada por deficiencia de vitamina K; la deficiencia de vitamina K puede ser causada por la administración de un agonista de vitamina K, tal como warfarina. La coagulopatía adquirida también puede ocurrir después de trauma extensivo. En este caso de otra manera conocida como el “ciclo de sangre viciada”, se caracteriza por hemodilución (trombocitopenia dilucional y dilución de factores de coagulación), hipotermia, consumo de factores de coagulación y alteraciones metabólicas (acidosis). La terapia de fluido y fibrinólisis incrementada pueden exacerbar esta situación. La hemorragia puede ser de cualquier parte del cuerpo.

[0247] La hemofilia A con “inhibidores” (es decir, alo-anticuerpos contra factor VIII) y hemofilia B con “inhibidores” (es decir, alo-anticuerpos contra factor IX) son ejemplos no limitantes de coagulopatías que son parcialmente congénitas y parcialmente adquiridos.

[248] Un ejemplo no limitante de una coagulopatía iatrogénica es una sobredosis de medicación con anticoagulantes - tales como heparina, aspirina, warfarina y otros inhibidores de agregación de plaquetas - que se puede prescribir para tratar enfermedad tromboembólica. Un segundo ejemplo no limitante de coagulopatía iatrogénica es aquel que es inducido por terapia de fluido excesiva y/o inapropiada, tal como aquella que puede ser inducida por una transfusión de sangre.

[0249] En una modalidad de la presente invención, la hemorragia está asociada con hemofilia A o B. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con hemofilia A o B con inhibidores adquiridos. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con trombocitopenia. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con enfermedad de von Willebrand. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con daño severo al tejido. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con trauma severo. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con cirugía. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con gastritis y/o enteritis hemorrágica. En otra modalidad, la hemorragia es sangrado uterino profuso, tal como en ruptura de la placenta. En otra modalidad, la hemorragia ocurre en órganos con una posibilidad limitada para hemostasis mecánica, tal como intracranealmente, intraauralmente o intraocularmente. En otra modalidad, la hemorragia está asociada con terapia con anticoagulante.

[0250] Un anticuerpo de la presente invención se puede usar para tratar a un sujeto con una coagulopatía. Por lo tanto, la invención es también el uso de un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI, para el tratamiento de un sujeto que necesita el mismo; así como el uso de ese anticuerpo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que necesita el mismo. Además, la invención es un método de tratamiento de un sujeto que necesita el mismo con un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI.

[0251] El uso del anticuerpo monoclonal de la invención puede reducir significativamente la pérdida de sangre.

[0252] El uso del anticuerpo monoclonal de la invención puede reducir significativamente el tiempo de sangrado.

[0253] Además, el uso del anticuerpo monoclonal de la invención puede reducir *in vivo* el tiempo de coagulación sin causar trombocitopenia transitoria.

Formas de realización

[0254] La siguiente es una lista no limitante de formas de realización de la presente invención:

Forma de realización 1: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse específicamente al dominio de K2 de TFPI, donde el anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo que comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste de E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, F35, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2.

Forma de realización 2: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 1, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende un epítipo que comprende el residuo E10 de SEC ID n.º: 2.

Forma de realización 3: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización

anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende un epítipo que comprende el residuo E11 de SEC ID n.º: 2.

5 Forma de realización 4: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo D12 de SEC ID n.º: 2.

10 Forma de realización 5: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las forma de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo P13 de SEC ID n.º: 2.

Forma de realización 6: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las forma de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo R17 de SEC ID n.º: 2.

15 Forma de realización 7: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo Y19 de SEC ID n.º: 2.

20 Forma de realización 8: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo T21 de SEC ID n.º: 2.

25 Forma de realización 9: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las forma de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo Y23 de SEC ID n.º: 2.

Forma de realización 10: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo F24 de SEC ID n.º: 2.

30 Forma de realización 11: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo N26 de SEC ID n.º: 2.

35 Forma de realización 12: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo Q28 de SEC ID n.º: 2.

40 Forma de realización 13: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo Q31 de SEC ID n.º: 2.

45 Forma de realización 14: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo C32 de SEC ID n.º: 2.

Forma de realización 15: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo E33 de SEC ID n.º: 2.

50 Forma de realización 16: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo R34 de SEC ID n.º: 2.

55 Forma de realización 17: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo F35 de SEC ID n.º: 2.

60 Forma de realización 18: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo K36 de SEC ID n.º: 2.

65 Forma de realización 19: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo L50 de SEC ID n.º: 2.

Forma de realización 20: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-16 y

18-19, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende los residuos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2.

5 Forma de realización 21: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-3,5-9, 12-13 y 15-19, donde el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende los residuos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2.

10 Forma de realización 22: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende residuos de aminoácidos:

- E, en la posición correspondiente a la posición 31,
- S, en la posición correspondiente a la posición 32,
- D, en la posición correspondiente a la posición 33,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 37,
- 15 • A, en la posición correspondiente a la posición 96,
- T, en la posición correspondiente a la posición 97 y
- F, en la posición correspondiente a la posición 99

20 de SEC ID n.º: 15;

y donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende residuos de aminoácidos:

- N, en la posición correspondiente a la posición 31,
- R, en la posición correspondiente a la posición 53,
- 25 • S, en la posición correspondiente a la posición 54,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 57,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 59,
- F, en la posición correspondiente a la posición 60,
- P, en la posición correspondiente a la posición 61,
- 30 • D, en la posición correspondiente a la posición 62,
- Q, en la posición correspondiente a la posición 65,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 102,
- D, en la posición correspondiente a la posición 103 y
- D, en la posición correspondiente a la posición 106

35 de SEC ID n.º: 18.

Forma de realización 23: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende residuos de aminoácidos:

- E, en la posición correspondiente a la posición 31,
- S, en la posición correspondiente a la posición 32,
- D, en la posición correspondiente a la posición 33,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 37,
- 45 • A, en la posición correspondiente a la posición 96,
- T, en la posición correspondiente a la posición 97 y
- F, en la posición correspondiente a la posición 99

50 de SEC ID n.º: 15;

y donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende residuos de aminoácidos:

- N, en la posición correspondiente a la posición 31,
- R, en la posición correspondiente a la posición 53,
- 55 • S, en la posición correspondiente a la posición 54,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 57,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 59,
- F, en la posición correspondiente a la posición 60,
- P, en la posición correspondiente a la posición 61,
- 60 • D, en la posición correspondiente a la posición 62,
- Q, en la posición correspondiente a la posición 65,
- Y, en la posición correspondiente a la posición 102,
- D, en la posición correspondiente a la posición 103 y
- D, en la posición correspondiente a la posición 106

65 de SEC ID n.º: 18.

- Forma de realización 24: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 22 o 23, donde la cadena pesada además comprende una S en la posición correspondiente a la posición 52 de SEC ID n.º: 18.
- 5 Forma de realización 25: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 22-23, donde la cadena ligera además comprende una H en la posición correspondiente a la posición 98 de SEC ID n.º: 15 y la cadena pesada además comprende una S en la posición correspondiente a la posición 56 de SEC ID n.º: 18.
- 10 Forma de realización 26: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente.
- 15 Forma de realización 27: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente.
- 20 Forma de realización 28: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.
Modalidad 29: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.
- 25 Forma de realización 30: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.
- 30 Forma de realización 31: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.
- 35 Forma de realización 32: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- 40 Forma de realización 33: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- 45 Forma de realización 34: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- 50 Forma de realización 35: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- 55 Forma de realización 36: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- 60 Forma de realización 37: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
- 65

Forma de realización 38: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.

Forma de realización 39: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.

Forma de realización 40: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.

Forma de realización 41: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.

Forma de realización 42: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente;

y donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos

pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.

Forma de realización 43: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente;

y donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSLIDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.

Forma de realización 44: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las modalidades 26-43, donde las sustituciones de aminoácidos no comprenden los aminoácidos:

- N, en la posición correspondiente a la posición 31

de la región CDR1 de SEC ID n.º: 18;

- R, en la posición correspondiente a la posición 53;
- S, en la posición correspondiente a la posición 54;
- S, en la posición correspondiente a la posición 56;
- Y, en la posición correspondiente a la posición 57;
- Y, en la posición correspondiente a la posición 59;
- F, en la posición correspondiente a la posición 60;
- P, en la posición correspondiente a la posición 61;
- D, en la posición correspondiente a la posición 62; y
- Q, en la posición correspondiente a la posición 65;

de la región CDR2 de SEC ID n.º: 18.

- Y, en la posición correspondiente a la posición 102;
- D, en la posición correspondiente a la posición 103; y
- D, en la posición correspondiente a la posición 106;

de la región CDR3 de SEC ID n.º: 18.

- E, en la posición correspondiente a la posición 31;
- S, en la posición correspondiente a la posición 32;
- D, en la posición correspondiente a la posición 33; y
- Y, en la posición correspondiente a la posición 37;

de la región CDR1 de SEC ID n.º: 15.

- A, en la posición correspondiente a la posición 96;
- T, en la posición correspondiente a la posición 97;
- H, en la posición correspondiente a la posición 98; y
- F, en la posición correspondiente a la posición 99;

de la región CDR3 de SEC ID n.º: 15.

- Forma de realización 45: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 26-44, donde la sustitución de aminoácido es una sustitución conservativa.
- 5 Forma de realización 46: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 26-45, donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende:
- una secuencia CDR1 que comprende aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18; y
- 10 • una secuencia CDR2 que comprende aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18; y
- una secuencia CDR3 que comprende aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18.
- Forma de realización 47: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 26-46, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende:
- 15 • una secuencia CDR1 que comprende aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15; y
- una secuencia CDR2 que comprende aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15; y
- 20 • una secuencia CDR3 que comprende aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15.
- Forma de realización 48: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 46-47, donde la cadena pesada comprende:
- 25 • una secuencia CDR1 que comprende aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18; y
- una secuencia CDR2 que comprende aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18; y
- 30 • una secuencia CDR3 que comprende aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18;
- y donde la cadena ligera comprende:
- una secuencia CDR1 que comprende aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15; y
- 35 • una secuencia CDR2 que comprende aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15; y
- una secuencia CDR3 que comprende aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15.
- 40 Forma de realización 49: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende SEC ID n.º: 15.
- Forma de realización 50: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende SEC ID n.º: 18.
- 45 Forma de realización 51: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo comprende SEC ID n.º: 15 y SEC ID n.º: 18.
- Forma de realización 52: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo comprende la cadena ligera de SEC ID n.º: 21.
- 50 Forma de realización 53: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el anticuerpo comprende la cadena pesada de SEC ID n.º: 24.
- Forma de realización 54: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 52-53, donde el anticuerpo comprende SEC ID n.º: 21 y SEC ID n.º: 24.
- Forma de realización 55: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, que es un anticuerpo humanizado.
- 60 Forma de realización 56: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 55, en el cual la región de marco de trabajo 2 de la cadena pesada comprende los aminoácidos:
- T, en la posición correspondiente a la posición 40,
- 65 • E, en la posición correspondiente a la posición 42,
- R, en la posición correspondiente a la posición 44 y

- A, en la posición correspondiente a la posición 49

de SEC ID n.º: 18.

- 5 Forma de realización 57: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 55, en el cual la región de marco de trabajo 2 de la cadena pesada comprende los aminoácidos correspondientes a las posiciones 36 a 49 (WVRQTPEKRLEWVA) de SEC ID n.º: 18.
- 10 Forma de realización 58: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-54, que es un anticuerpo humano.
- Forma de realización 59: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-54, que es un anticuerpo quimérico.
- 15 Forma de realización 60: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores, donde el isotipo de ese anticuerpo es IgG.
- Forma de realización 61: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 60, donde el isotipo es IgG1, IgG2 o IgG4
- 20 Forma de realización 62: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 61, donde el isotipo de ese anticuerpo es IgG4.
- Forma de realización 63: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 60-62, donde por lo menos un aminoácido de la región Fc de ese anticuerpo ha sido sustituido con otro aminoácido.
- 25 Forma de realización 64: El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores donde la región Fc de ese anticuerpo es por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, tal como por lo menos 90%, tal como por lo menos 95%, tal como 95-100% idéntica a los aminoácidos 122-448 de SEC ID n.º: 24.
- 30 Forma de realización 65: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb0281.
- Forma de realización 66: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-64, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb0281.
- 35 Forma de realización 67: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb4904.
- Forma de realización 68: Un anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-66, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb4904.
- 40 Forma de realización 69: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb2974.
- 45 Forma de realización 70: Un anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-68, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb2974.
- Forma de realización 71: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb29741.
- 50 Forma de realización 72: Un anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-70, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI con una afinidad mayor que mAb29741.
- 55 Forma de realización 73: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI, donde la K_D de ese anticuerpo es menor que 0.8 nM, tal como menor que 0.7 nM, tal como menor que 0.6 nM, tal como menor que 0.5 nM, tal como menor que 0.4 nM, tal como menor que 0.3 nM, tal como menor que 0.2 nM, tal como menor que 0.1 nM, tal como menor que 0.05 nM, tal como menor que 0.025 nM.
- 60 Forma de realización 74: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-73, donde la K_D de ese anticuerpo es menor que 0.8 nM, tal como menor que 0.7 nM, tal como menor que 0.6 nM, tal como menor que 0.5 nM, tal como menor que 0.4 nM, tal como menor que 0.3 nM, tal como menor que 0.2 nM, tal como menor que 0.1 nM, tal como menor que 0.05 nM, tal como menor que 0.025 nM.
- 65 Forma de realización 75: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI asociado a plaquetas.

Forma de realización 76: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores que es capaz de inhibir TFPI soluble.

5 Forma de realización 77: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 76, donde el TFPI soluble puede ser completamente inhibido.

Forma de realización 78: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores que es capaz de inhibir TFPI unido a lipoproteína.

10

Forma de realización 79: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores que es capaz de inhibir TFPI unido a células endoteliales.

Forma de realización 80: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI de tal manera que FXa retiene su actividad en por lo menos 91%, tal como por lo menos 92%, tal como por lo menos 93%, tal como por lo menos 94%, tal como por lo menos 95%, tal como por lo menos 96%, tal como por lo menos 97%, tal como por lo menos 98%, tal como por lo menos 99%, tal como 99-100%, como se mide en una prueba de inhibición de FXa.

15

Forma de realización 81: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-79, que es capaz de unirse a TFPI de tal manera que FXa retiene su actividad en por lo menos 91%, tal como por lo menos 92%, tal como por lo menos 93%, tal como por lo menos 94%, tal como por lo menos 95%, tal como por lo menos 96%, tal como por lo menos 97%, tal como por lo menos 98%, tal como por lo menos 99%, tal como 99-100% como se mide en una prueba de inhibición de FXa.

20

Forma de realización 82: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI de tal manera que el porcentaje de TFPI libre en un sujeto es reducido a menos de 30%, tal como menos de 29%, tal como menos de 28%, tal como menos de 27%, tal como menos de 26%, tal como menos de 25%, tal como menos de 24%, tal como menos de 23%, tal como menos de 22%, tal como menos de 21%, tal como menos de 20%, tal como menos de 19%, tal como menos de 18%, tal como menos de 17%, tal como menos de 16%, tal como menos de 15%, tal como menos de 14%, tal como menos de 13%, tal como menos de 12%, tal como menos de 11%, tal como menos de 10%, tal como menos de 9%, tal como menos de 8%, tal como menos de 7%, tal como menos de 6%, tal como menos de 5%, tal como menos de 4%, tal como menos de 3%, tal como menos de 2%, tal como menos de 1%, tal como entre 1% y 0%.

25

30

Forma de realización 83: Un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-81, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI de tal manera que el porcentaje de TFPI libre en un sujeto es reducido a menos de 30%, tal como menos de 29%, tal como menos de 28%, tal como menos de 27%, tal como menos de 26%, tal como menos de 25%, tal como menos de 24%, tal como menos de 23%, tal como menos de 22%, tal como menos de 21%, tal como menos de 20%, tal como menos de 19%, tal como menos de 18%, tal como menos de 17%, tal como menos de 16%, tal como menos de 15%, tal como menos de 14%, tal como menos de 13%, tal como menos de 12%, tal como menos de 11%, tal como menos de 10%, tal como menos de 9%, tal como menos de 8%, tal como menos de 7%, tal como menos de 6%, tal como menos de 5%, tal como menos de 4%, tal como menos de 3%, tal como menos de 2%, tal como menos de 1%, tal como entre 1% y 0%.

35

40

Forma de realización 84: El anticuerpo monoclonal de conformidad con la forma de realización 83, donde la cantidad de TFPI libre en un sujeto es reducido a ese porcentaje durante los primeros 28 días, tal como durante los primeros 27 días, tal como durante los primeros 26 días, tal como durante los primeros 25 días, tal como durante los primeros 24 días, tal como durante los primeros 23 días, tal como durante los primeros 22 días, tal como durante los primeros 21 días, tal como durante los primeros 20 días, tal como durante los primeros 19 días, tal como durante los primeros 18 días, tal como durante los primeros 17 días, tal como durante los primeros 16 días, tal como durante los primeros 15 días, tal como durante los primeros 14 días, tal como durante los primeros 13 días, tal como durante los primeros 12 días, tal como durante los primeros 11 días, tal como durante los primeros 10 días, tal como durante los primeros 9 días, tal como durante los primeros 8 días, tal como durante los primeros 7 días, tal como durante los primeros 6 días, tal como durante los primeros 5 días, tal como durante los primeros 4 días, tal como durante los primeros 3 días, tal como durante los primeros 2 días, tal como durante el primer día después de la administración del anticuerpo monoclonal al individuo.

45

50

55

Forma de realización 85: Un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI y que es capaz de neutralizar la inhibición por TFPI de FVIIa/TF/FXa unido a membrana en por lo menos 55%, tal como por lo menos 60%, tal como por lo menos 65%, tal como por lo menos 70%, tal como por lo menos 75%, tal como por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, tal como por lo menos 90%, tal como por lo menos 95%, tal como hasta 100%, tal como 100%, como se mide en una prueba de inhibidor de FVIIa/TF/FXa, cuando TFPI es saturado con el anticuerpo.

60

Forma de realización 86: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-84, donde el anticuerpo es capaz de neutralizar la inhibición por TFPI de FVIIa/TF/FXa unido a membrana en por lo menos 55%, tal como por lo menos 60%, tal como por lo menos 65%, tal como por lo menos 70%, tal como por lo menos 75%, tal como por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, tal como por lo menos 90%, tal como por lo menos 95%, tal

65

como hasta 100%, tal como 100%, como se mide en una prueba de inhibidor de FVIIa/TF/FXa, cuando TFPI es saturado con ese anticuerpo.

5 Forma de realización 87: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI y que reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin reducir significativamente el conteo de plaquetas.

Forma de realización 88: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-86, donde el anticuerpo reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin reducir significativamente el conteo de plaquetas.

10 Forma de realización 89: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con formas de realización 88, donde el conteo de plaquetas no caen a aproximadamente 80%, tal como aproximadamente 75%, tal como aproximadamente 70%, tal como aproximadamente 65%, tal como aproximadamente 60%, tal como aproximadamente 55%, tal como aproximadamente 50%, tal como aproximadamente 45%, tal como aproximadamente 40%, tal como aproximadamente 35%, tal como aproximadamente 30%, tal como aproximadamente 25% del conteo de plaquetas original.

15 Forma de realización 90: Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de K2 de TFPI y que reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin causar trombocitopenia transitoria.

20 Forma de realización 91: El anticuerpo monoclonal, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-89, donde el anticuerpo reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin causar trombocitopenia transitoria.

Forma de realización 92: Un fragmento del anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización anteriores.

25 Forma de realización 93: El fragmento de conformidad con la forma de realización 92, que es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv o un fragmento dAb.

Forma de realización 94: Una variante del anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización, que es una variante de delección o una variante de inserción.

30 Forma de realización 95: Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94.

35 Forma de realización 96: Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94, donde la formulación es adecuada para uso parenteral.

Forma de realización 97: Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94, donde el anticuerpo es adecuado para uso intravenoso.

40 Forma de realización 98: Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94, donde el anticuerpo es adecuado para uso intramuscular.

Forma de realización 99: Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94, donde el anticuerpo es adecuado para uso subcutáneo.

45 Forma de realización 100: El uso del anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94 para la fabricación de un medicamento adecuado para administración parenteral.

50 Forma de realización 101: El uso del anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94 para la fabricación de un medicamento adecuado para administración intravenosa.

Forma de realización 102: El uso del anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94 para la fabricación de un medicamento adecuado para administración intramuscular.

55 Forma de realización 103: El uso del anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94 para la fabricación de un medicamento adecuado para administración subcutánea.

Forma de realización 104: El uso un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94, para el tratamiento de un sujeto con una coagulopatía.

60 Forma de realización 105: El uso de conformidad con la forma de realización 104, donde el sujeto tiene alguna coagulopatía congénita, adquirida y/o iatrogénica, tal como puede ser seleccionada del grupo que consiste de hemofilia A, con o sin inhibidores, y hemofilia B, con o sin inhibidores.

65 Forma de realización 106: El uso de conformidad con cualquiera de las formas de realización 95-105, donde el anticuerpo monoclonal significativamente reduce la pérdida de sangre.

- Forma de realización 107: El uso de conformidad con cualquiera de las formas de realización 95-106, donde el anticuerpo monoclonal significativamente reduce el tiempo de sangrado.
- 5 Forma de realización 108: El uso de conformidad con cualquiera de las formas de realización 95-107, donde la cantidad de anticuerpo monoclonal administrada da por resultado una concentración en el plasma de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml, tal como aproximadamente 15-35 µg/ml, tal como aproximadamente 10-15 µg/ml, tal como aproximadamente 15-20 µg/ml, tal como aproximadamente 20-25 µg/ml, tal como aproximadamente 25-30 µg/ml, tal como aproximadamente 30-35 µg/ml, tal como aproximadamente 35-40 µg/ml, del anticuerpo monoclonal.
- 10 Forma de realización 109: Un método para tratar a un sujeto con una coagulopatía, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94.
- 15 Forma de realización 110: El método de conformidad con la forma de realización 109, donde la coagulopatía es cualquier coagulopatía congénita, adquirida y/o iatrogénica, tal como puede ser seleccionada del grupo que consiste de hemofilia A, con o sin inhibidores, y hemofilia B, con o sin inhibidores.
- 20 Forma de realización 111: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-110, donde el anticuerpo monoclonal es capaz de reducir significativamente la pérdida de sangre.
- 25 Forma de realización 112: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-111, donde el anticuerpo monoclonal es capaz de reducir significativamente el tiempo de sangrado.
- Forma de realización 113: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-112, donde la cantidad de anticuerpo monoclonal administrada es tal como para saturar su objetivo.
- Forma de realización 114: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-113, donde la cantidad de anticuerpo monoclonal administrada es tal como para saturar TFPI soluble.
- 30 Forma de realización 115: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-114, donde el anticuerpo administrado es capaz de inhibir completamente TFPI soluble.
- Forma de realización 116: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-115, donde el anticuerpo monoclonal es administrado en una cantidad suficiente para saturar TFPI unido a endotelio.
- 35 Forma de realización 117: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-116, donde la cantidad de anticuerpo monoclonal administrada da por resultado una concentración en el plasma de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml, tal como aproximadamente 15-35 µg/ml, tal como aproximadamente 10-15 µg/ml, tal como aproximadamente 15-20 µg/ml, tal como aproximadamente 20-25 µg/ml, tal como aproximadamente 25-30 µg/ml, tal como aproximadamente 30-35 µg/ml, tal como aproximadamente 35-40 µg/ml, del anticuerpo monoclonal.
- 40 Forma de realización 118: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-117, donde se puede administrar una sola dosis.
- 45 Forma de realización 119: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-118, donde se pueden administrar dosis múltiples.
- Forma de realización 120: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-119, donde se puede administrar diariamente el anticuerpo.
- 50 Forma de realización 121: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-120, donde el anticuerpo se puede administrar cada dos días.
- Forma de realización 122: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-121, donde el anticuerpo se puede administrar cada tres días.
- 55 Forma de realización 123: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-122, donde el anticuerpo se puede administrar cada cuatro días.
- Forma de realización 124: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-123, donde el anticuerpo se puede administrar cada cinco días.
- 60 Forma de realización 125: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-124, donde el anticuerpo se puede administrar cada seis días.
- 65 Forma de realización 126: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-125, donde el

anticuerpo monoclonal se puede administrar aproximadamente cada semana, tal como cada 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.

Forma de realización 127: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-126, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar aproximadamente cada dos semanas, tal como cada 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 días.

Forma de realización 128: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-127, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar aproximadamente cada tres semanas, tal como cada 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 días.

Forma de realización 129: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-128, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar aproximadamente cada cuatro semanas, tal como cada 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días.

Forma de realización 130: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-129, donde la dosis puede ser aproximadamente 0.1-10 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-1 mg/kg, tal como aproximadamente 1-2 mg/kg o aproximadamente 2-3 mg/kg o aproximadamente 4-5 mg/kg o aproximadamente 5-6 mg/kg o aproximadamente 6-7 mg/kg o aproximadamente 7-8 mg/kg o aproximadamente 8-9 mg/kg o aproximadamente 9-10 mg/kg; o aproximadamente 10-21 mg/kg, tal como aproximadamente 10-11 mg/kg, o aproximadamente 11-12 mg/kg, o aproximadamente 12-13 mg/kg, o aproximadamente 13-14 mg/kg, o aproximadamente 14-15 mg/kg, o aproximadamente 15-16 mg/kg, o aproximadamente 16-17 mg/kg, o aproximadamente 17-18 mg/kg, o aproximadamente 18-19 mg/kg, o aproximadamente 19-20 mg/kg o aproximadamente 20-21 mg/kg.

Forma de realización 131: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-130, donde la dosis puede ser aproximadamente 2 a 200 mg/kg, tal como aproximadamente 150-200 mg/kg, tal como aproximadamente 150-170 mg/kg, tal como aproximadamente 100-150 mg/kg, tal como aproximadamente 50-100 mg/kg, tal como aproximadamente 70-90 mg/kg, tal como aproximadamente 10-50 mg/kg, tal como aproximadamente 10-30 mg/kg.

Forma de realización 132: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-131, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar por vía parenteral.

Forma de realización 133: El método de conformidad con la forma de realización 132, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar por vía intravenosa.

Forma de realización 134: El método de conformidad con la forma de realización 133, donde la dosis del anticuerpo monoclonal puede ser aproximadamente 10-20 mg/kg.

Forma de realización 135: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 133-134, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada dos semanas.

Forma de realización 136: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 133-135, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada tres semanas.

Forma de realización 137: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 133-136, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada cuatro semanas.

Forma de realización 138: El método de conformidad con la forma de realización 133, donde la dosis del anticuerpo monoclonal puede ser aproximadamente 10-20 mg/kg y el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada dos semanas.

Forma de realización 139: El método de conformidad con la forma de realización 133, donde la dosis del anticuerpo monoclonal puede ser aproximadamente 10-20 mg/kg y el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada tres semanas.

Forma de realización 140: El método de conformidad con la forma de realización 133, donde la dosis del anticuerpo monoclonal puede ser aproximadamente 10-20 mg/kg y el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada cuatro semanas.

Forma de realización 141: El método de conformidad con la forma de realización 132, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar por vía intramuscular.

Forma de realización 142: El método de conformidad con la forma de realización 132, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar por vía subcutánea.

Forma de realización 143: El método de conformidad con la forma de realización 132, donde la dosis del anticuerpo

monoclonal puede ser aproximadamente 1 mg/kg.

Forma de realización 144: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 141-143, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar diariamente.

Forma de realización 145: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 141-144, donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada dos días.

Forma de realización 146: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 141-145, donde la dosis del anticuerpo monoclonal puede ser aproximadamente 1 mg/kg y donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar diariamente.

Forma de realización 147: El método de conformidad con la forma de realización cualquiera de las formas de realización 141-146, donde la dosis del anticuerpo monoclonal puede ser aproximadamente 1 mg/kg y donde el anticuerpo monoclonal se puede administrar cada dos días.

Forma de realización 148: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-147, donde el anticuerpo se puede administrar profilácticamente.

Forma de realización 149: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-148, donde el anticuerpo se puede administrar terapéuticamente (sobre demanda).

Forma de realización 150: El método de conformidad con cualquiera de las formas de realización 109-149, donde el anticuerpo administrado es capaz de inhibir completamente (100%) TFPI soluble.

Forma de realización 151: Un polinucleótido que codifica el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94.

Forma de realización 152: Un polinucleótido de conformidad con la forma de realización 151, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID n.ºs: 13, 16, 19 y 22.

Forma de realización 153: Un polinucleótido de conformidad con la forma de realización 152, que comprende SEC ID n.º: 19.

Forma de realización 154: Un polinucleótido de conformidad con la forma de realización 152, que comprende SEC ID n.º: 22.

Forma de realización 155: Un polinucleótido de conformidad con la forma de realización 152, que comprende SEC ID n.ºs: 19 y 22.

Forma de realización 156: Una célula eucariótica que comprende el polinucleótido de conformidad con cualquiera de las formas de realización 151-155.

Forma de realización 157: Una célula eucariótica que expresa el anticuerpo monoclonal, o fragmento del mismo, de conformidad con cualquiera de las formas de realización 1-94.

Forma de realización 158: La célula eucariótica de conformidad con la forma de realización 157, que es una célula de mamífero.

Forma de realización 159: La célula eucariótica de conformidad con la forma de realización 157, que es una célula de levadura.

Forma de realización 160: La célula de mamífero de conformidad con la forma de realización 158, que se selecciona del grupo que consiste en células HEK293, CHO, BHK, NSO y de retina humana.

Ejemplos

[0255] La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse como limitantes.

Ejemplo 1: Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra TFPI

[0256] Se generaron anticuerpos monoclonales contra inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Un anticuerpo monoclonal que tenía la especificidad de unión deseada fue identificado, clonado y secuenciado. Este anticuerpo se encontró que reducía significativamente el tiempo de sangrado de la cutícula *in vivo* y conducía a caída no significativa en el número de plaquetas.

Métodos y resultados

5 [0257] Todos los kits se usaron de conformidad con las instrucciones del fabricante. Abreviaturas: HC: cadena pesada; LC: cadena ligera; VH: dominio variable - cadena pesada; VL: dominio variable - cadena ligera; PCR: reacción en cadena de polimerasa.

Inmunización y fusión

10 [0258] Los ratones fueron inmunizados tanto con TFPI de longitud completa como con TFPIB161B versión corta que contenía sólo los primeros dos dominios de Kunitz. Ratones RBF se usaron para inmunizaciones y producción de anticuerpos monoclonales de ratón. Las inyecciones se hicieron subcutáneamente en el dorso de los ratones. 20 µg de proteína se mezcló con adyuvante de Freund completo para la primera inyección. En las inmunizaciones subsecuentes, adyuvante de Freund incompleto se usó con la misma concentración del antígeno. Diez días después de la última
15 inmunización, sangre ocular de los ratones se determinó selectivamente por ELISA para anticuerpos específicos de TFPI. Los ratones con títulos de suero positivos fueron reforzados con 10 µg de TFPI mediante inyección intravenosa, y fueron sacrificados después de tres días. Los bazos se quitaron asépticamente y se dispersaron a una suspensión de células individuales. La fusión de células del bazo y células de mieloma se hizo mediante el método de PEG o por electrofusión.

20 *Prueba de unión: ELISA*

[0259] Inmunoplasmas fueron revestidas con IgG anti-ratón. Sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma se añadieron a las placas y, después de lavar, se añadió TFPI o TFPIB161B humano biotinilado soluble para probar unión
25 específica.

Pruebas de neutralización: prueba de FXa y prueba de TF/FVIIa/Fxa

30 [0260] Prueba de inhibición de FXa: una concentración fija de TFPI que dio origen a 90% de inhibición de FXa fue preincubada con sobrenadantes de cultivo de células de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales anti TFPI y se añadieron a Fxa y sustrato cromogénico específico de FXa. Esta prueba enfrenta unión de TFPI a FXa (descrito con mayor detalle en el ejemplo 6).

35 [0261] Prueba de inhibición de FVIIa/TF/FXa: 1) Incubación de sobrenadantes de cultivo de células de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales anti TFPI y e inhibición de anti TFPI fijada (90% de inhibición de FVIIa/TF); 2) Incubación de TFPI + FVIIa + TF + Fxa; 3) Adición de FX (FX>> FXa) seguido por incubación con sustrato cromogénico de FXa (descrito con mayor detalle en el ejemplo 7).

Tiempo de protrombina diluida (DPT)

40 [0262] Un análisis de protrombina diluida (PT): plasma humano en combinación con tromboplastina humana diluida (fuente de TF). El tiempo de coagulación en el plasma se midió bajo la adición de concentraciones de anticuerpo monoclonal de TFPI purificadas con proteína A incrementada para buscar reducción dependiente de la dosis de tiempo de coagulación. FVIIa (25 nM) fue el control positivo y debe acortar este tiempo de coagulación.
45

Análisis de interacción de unión

50 [0263] El análisis de interacción de unión se obtuvo mediante resonancia de plasmón de superficie en Biacore 3000. La captura del anticuerpo monoclonal relevante a una concentración fija se obtuvo con anti-IgG de ratón inmovilizada. Diferentes concentraciones de TFPI se probaron. La determinación de constantes de unión ($K_{\text{asociación}}$, $K_{\text{disociación}}$, K_D) se obtuvo al suponer una interacción de TFPI 1:1 y el anticuerpo de interés (descrito con mayor detalle en el ejemplo 8).

Tromboelastografía

55 [0264] Esta registra la cinética de formación de coágulo y fibrinólisis en sangre entera. La condición similar a hemofilia A es inducida al pre-incubar la sangre con IgG anti-FVIII neutralizante.

Clonación y secuenciación de anticuerpo

60 [0265] Secuencias de cadena pesada y cadena ligera de ratón para un anticuerpo anti-TFPI se clonaron de un hibridoma: TFPI-4F36A1B2 (abreviado aquí a 4F36). El ARN total, extraído de células de hibridoma mediante el uso del RNeasy-Mini Kit de Qiagen, se usó como plantillas para síntesis de ADNc. ADNc se sintetizó en una reacción 5'-RACE mediante el uso del kit de amplificación de ADN SMARTTM RACE de Clontech. Amplificación objetivo subsecuente de secuencias de HC y LC se realizó por PCR mediante el uso de polimerasa de Phusion Hot Star (Finnzymes) y la mezcla de cebador universal (UPM) incluida en el kit SMARTTM RACE como un cebador hacia adelante. Un cebador inverso
65 con la siguiente secuencia se usó para amplificación de HC (dominio de VH): 5'-CCCTTGACCAGGCATCCAG-

3'(cebador #129). Un cebador inversas con la siguiente secuencia se usó para amplificación de LC: 5'-GCTCTAGACTAACAACCTCATTCTGTTGAAGCTCTTG-3' (cebador #69).

[0266] Los productos de PCR se separaron por electroforesis de gel, extraído mediante el uso de ADN de GFX PCR y kit de purificación de banda de gel de GE Healthcare Bio-Sciences y clonado para secuenciación mediante el uso de kit de clonación de PCR con un Zero Blunt TOPO y TOP10 *E. coli* químicamente competente de Invitrogen. PCR de colonia se realizó sobre colonias seleccionadas mediante el uso de una mezcla de AmpliTaq Gold Mas-ter de Applied Biosystems y cebadores M13uni/M13rev. La limpieza de PCR de colonias se realizó mediante el uso de mezcla de enzimas de ExoSAP-IT (usb). La secuenciación se realizó un MWG Biotech, Martinsried, Alemania mediante el uso ya sea de cebadores de secuenciación M13uni(-21)/M13rev(-29) o T3/T7. Las secuencias se analizaron y se anotaron mediante el uso del programa VectorNTI.

[0267] A partir del TFPI-4F36A1B2 de hibridoma un solo LC de tipo kappa de ratón único se identificó y una sola HC de ratón única, subclase IgG1. La secuencia de LC se da en SEC ID n.º: 6 y la secuencia de HC se da en la SEC ID n.º: 10. Las secuencias VH y VL se muestran en las figuras 2A-2B, secuencias de péptido líderes no se incluyen.

Epítodos

[0268] TFPI1 incluye tres dominios de Kunitz (véase figura 4). Los residuos accesibles a la superficie de los dominios de Kunitz de TFPI1 se identificaron a partir de estructuras existentes de TFPI1-2. En particular, residuos con accesibilidad relativa mayor de 40% se considera que son accesibles a la superficie. Para TFPI1-2 esto comprende (véase figura 5): los aminoácidos 94-95, 98, 100-110, 118-121, 123-124, 131, 134 138-142 y 144-145.

Ejemplo 2: Clonación y secuenciación de TFPI4F36A1B2 mAb de ratón

[0269] Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de secuencias de cadena pesada y cadena ligera de ratón de anticuerpo anti-TFPI: TFPI4F36A1B2.

ARN total se extrajo de células de hibridoma mediante el uso de RNeasy-Mini Kit de Qiagen y se usó como plantilla para síntesis de ADNC. ADNC se sintetizó en una reacción de 5'-RACE mediante el uso del kit de amplificación de ADNC SMARTTM RACE de Clontech. La amplificación por objetivo subsecuente de secuencias de HC y LC se realizó mediante PCR con el uso de polimerasa de Phusion Hot Start (Finnzymes) y la mezcla de cebadores universal (UPM), incluida en el kit SMARTTM RACE como cebador hacia adelante. El cebador reverso identificado como SEC ID n.º: 11 se usó para amplificación de HC (dominio VH) y el cebador reverso identificado como SEC ID n.º: 12 se usó para amplificación de LC. Los productos de PCR se separaron por electroforesis de gel, se extrajeron mediante el uso de ADN de GFX PCR y el kit de purificación de banda de gel de GE Healthcare Bio-Sciences y se clonaron para secuenciación mediante el uso del Kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO y TOP10 *E. coli* químicamente competente(Invitrogen). La PCR de colonias se realizó sobre colonias seleccionadas mediante el uso de AmpliTaq Gold Master Mix de Applied Biosystems y cebadores M13uni/M13rev. La limpieza de PCR de colonias se realizó mediante el uso de la mezcla de enzimas de ExoSAP-IT (USB). La secuenciación se realizó en MWG Biotech, Martinsried, Alemania mediante el uso de cebadores de secuenciación M13uni(-21)/M13rev(-29) o T3/T7. Las secuencias se analizaron y se anotaron mediante el uso del programa VectorNTI. Todos los kits y reactivos se usaron de conformidad con las instrucciones del fabricante. Un solo LC de tipo kappa de ratón único y un solo HC de ratón único, subclase IgG1 se identificó. Las secuencia de ácido nucleico y aminoácidos para la cadena ligera variable se muestran en SEC ID n.ºs: 3 y 5, respectivamente. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para la cadena pesada variable se muestran en SEC ID n.ºs: 7 y 9, respectivamente. Las secuencias de péptido líder no se incluyen en estas secuencias.

Búsquedas en BLAST

[0270] Las secuencias de aminoácidos de VL y VH anti-TFPI4F36A1B2 traducidas se usaron como secuencias de preguntas. Las búsquedas en BLAST se realizaron contra secuencias en la base de datos Uniprot mediante el uso del programa de traducciones BLASTp. La salida para anti-TFPI4F36A1B2 VL produce alineaciones de las cuales >20 de las 50 puntuaciones de identidad más altas fueron secuencias de cadena pesada de Ig de ratón. Las puntuaciones de identidad más altas fueron 81% (99/121) contra una cadena pesada de Ig de ratón. La salida para anti-TFPI4F36A1B2 VL produce alineaciones de las cuales >30 de las 50 puntuaciones de identidad más altas fueron secuencias de cadena ligera kappa de Ig de ratón. La puntuación de identidad más alta fue de 92% (105/113) contra una cadena ligera kappa de Ig de ratón. En conclusión, las secuencias de VH y VL para anti-TFPI4F36A1B2 representan secuencias únicas nuevas.

Generación de vectores de expresión anti-TFPI4F36A1B2 de ratón

[0271] Una serie de vectores de expresión basados en promotor de CMV (vectores pTT) se generaron para expresión transitoria del anticuerpo TFPI4F36 de ratón en el sistema de expresión a base de HEK293-6E EBNA desarrollado por Yves Durocher (Durocher *et al.* Nucleic Acid Research, 2002). Además del promotor de CMV, los vectores contienen un origen de pMB1, un origen de EBV y el gen de resistencia a Amp. La región correspondiente a anti-TFPI4F36A1B2 LC de longitud completa (que incluye las secuencias de péptido de señal original) fue amplificado por PCR a partir de los clones de secuenciación TOPO originales mediante el uso de cebadores específicos para secuencias N y C- terminales. El cebador de sentido contenía secuencias de un sitio de restricción HindIII terminal para propósitos de clonación y una

secuencia de Kozak (5'-GCCGCCACC-3') inmediatamente en orientación 5' del codón de inicio ATG. El cebador de anti-sentido contenía un codón de detención seguido por una secuencia de sitio de restricción XbaI, inmediatamente en orientación 3' de la secuencia codificante. El fragmento de PCR generado fue digerido por restricción, clonado en el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector vasado en pTT linealizado y transformado en *E. coli* para selección. La secuencia del constructo final fue verificada por secuenciación de ADN.

[0273] La región correspondiente al dominio VH (que incluye la secuencia de péptido de señal original) fue amplificada por PCR a partir de los clones de secuenciación TOPO originales mediante el uso de cebadores específicos para la secuencia N-terminal y secuencia de transición de VH/CH. El cebador de sentido contenía secuencias de un sitio de restricción NotI terminal para propósitos de clonación y una secuencia de Kozak (5'-GCCGCCACC-3') inmediatamente en orientación 5' del codón de inicio ATG. El cebador de anti-sentido contenía un sitio de restricción NheI en marco en orientación 3' de la transición de VH/CH. El fragmento de PCR de dominio de VH generado fue digerido por restricción, clonado en un vector linealizado que contenía la secuencia de dominio CH para una IgG1 de ratón y transformada en *E. coli*. Para selección. La secuencia del constructo final fue verificada por secuenciación de ADN.

[0274] El anticuerpo anti-TFPI4F36AIB2 clonado y recombinantemente expresado tuvo el mismo perfil y afinidad en todas las pruebas usadas, que el anticuerpo derivado del hibridoma original. Los procedimientos usados para expresión transitoria en células HEK293-6E se describen en el ejemplo 3.

Ejemplo 3: Diseño y construcción de un TFPI4F36 mAb humanizado

[0275] Las secuencias de anti-TFPI4F36AIB2 CDR de ratón se anotaron de conformidad con la definición de Kabat y se encontró que era como sigue:

CDR-H1: NYAMS (aminoácidos 31-35 de SEC ID n.º: 8).

CDR-H2: TISRSGSYSYFPDSVQG (aminoácidos 50-66 de SEC ID n.º: 8).

CDR-H3: LGGYDEGDAMDS (aminoácidos 99-110 de SEC ID n.º: 8).

CDR-L1: KSSQSLLESDGKTYLN (aminoácidos 24-39 de SEC ID n.º: 4).

CDR-L2: LVSILDS (aminoácidos 55-61 de SEC ID n.º: 4).

CDR-L3: LQATHFPQT (aminoácidos 94-102 de SEC ID n.º: 4).

[0276] Un modelo 3D de anti-TFPI4F36AIB2 se construyó en Modeller (www.salilab.org/modeller/) basado en las plantillas estructurales 2GJJ (mAB contra Her2erbb2) y 1X9Q (hAB contra flouresceína).

[0277] Una búsqueda en BLASTp en una base de datos de línea germinal V humana con anti-TFPI4F36AIB2 VL y VH regresó las siguientes cuatro secuencias de línea germinal potenciales:

Cadena pesada: VH3_21 o VH7183.9 (valores-E < 1e-45)

Cadena ligera: VKII_A18 o VKII_A1 (valores-E- < 3e-45)

[0278] Después de la inspección manual de número de ocurrencias y alineaciones, las secuencias de línea germinal VH3_21 y VKII_A18 se seleccionaron como marcos de trabajo de humanización de HC y LC, respectivamente. Los segmentos J de línea germinal correspondientes se seleccionaron con base en alineación de secuencia como JH6 y JK4. La alineación entre anti-TFPI4F36AIB2 y las secuencias de línea germinal seleccionadas se muestran en combinación con la primera versión injertada de CDR del TFPI4F36 humanizado. La identidad de secuencia entre anti-TFPI4F36AIB2 y los armazones proteínicos humanos (HC: VH3_21/JH6 y LC: VKII_A18/JK4) es muy alta como se ilustra mediante asteriscos debajo de la secuencia. Cada asterisco marca una posición de identidad de secuencia. El constructo VH humanizado inicial fue diseñado de conformidad con una estrategia de injerto de CDR mínima, en la cual CDR-H2 es injertado en una versión más corta (residuos 50-58) que la definición de kabat (residuo 50-66). Los 5 CDRs restantes fueron injertados de conformidad con la definición de Kabat. Las CDRs (definición de Kabat) se alistan tal como son injertadas a continuación; los residuos mostrados en negrilla para CDR-H2 son residuos de línea germinal humanos.

CDR-H1: NYAMS (aminoácidos 31-35 de SEC ID n.º: 18).

CDR-H2: TISRSGSYSY**YADSVKG** (aminoácidos 50-66 de SEC ID n.º: 28).

CDR-H3: LGGYDEGDAMDS (aminoácidos 99-110 de SEC ID n.º: 18).

CDR-L1: KSSQSLLESDGKTYLN (aminoácidos 24-39 de SEC ID n.º: 15).

CDR-L2: LVSILDS (aminoácidos 55-61 de SEC ID n.º: 15).

CDR-L3: LQATHFPQT (aminoácidos 94-102 de SEC ID n.º: 15).

[0279] La composición de CDR-H2 en la variante humanizada HzTFPI4F36 se enlista a continuación y concuerda con CDR-H2 listado para el anticuerpo anti-TFPI4F36A1B2 de ratón.

CDR-H2: TISRSGSYSYFPDSVQG (aminoácidos 50-66 de SEC ID n.º: 18).

[0280] La figura 1 muestra las secuencias de los dominios de VH (A) y VL (B) de anti- TFPI4F36A1B2 de ratón (SEC ID n.ºs: 8 y 4, respectivamente) alineadas con secuencias de línea germinal humanas (SEC ID n.ºs: 32 y 31, respectivamente) y las secuencias de TFPI4F36 humanizadas injertadas con CDR (SEC ID n.ºs: 28 y 26, respectivamente). Se usa el esquema de numeración de Kabat, como se mostró anteriormente las secuencias en la figura, y CDRs de conformidad con la definición de Kabat se muestran en negrillas. Las diferencias en las regiones de marco de trabajo entre las secuencias entre anti-TFPI4F36A1B2 de ratón y las secuencias de línea germinal son resaltadas en gris en la secuencia de anti-TFPI4F36A1B2. Los asteriscos indican posiciones de identidad de secuencia entre las secuencias de TFPI4F36 de ratón y de línea germinal humana. Retromutaciones potenciales son resaltadas en gris en la secuencia injertada con HzTFPI4F36-CDR (listada como injerto de hz4F36CDR).

[0281] Retromutaciones potenciales para los constructos injertados con HzTFPI4F36-CDR fueron injertados con base en las diferencias potenciales encontradas en las regiones de marco de trabajo de la secuencia de TFPI4F36 de ratón y la secuencia de línea germinal. Una figura 1 3D muestra el modelo de secuencias del fragmento TFPI4F36 también se usó para identificar y priorizar retromutaciones potenciales. La lista de retromutaciones generadas en TFPI4F36 LC y HC humanizado se muestra en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Generación de vectores de expresión para TFPI4F36 humanizado

[0282] Secuencias de ADN para regiones TFPI4F36 VH y VL humanizadas fueron sintetizadas (GENEART AG) de conformidad con el diseño de humanización del anticuerpo descrito anteriormente. Las secuencias se obtuvieron con el injerto de CDR mínimo básico y sin retromutaciones adicionales. Las secuencias de péptido líder de línea germinal LC y HC respectivas se incluyeron en los constructos así como una secuencia de Kozak (5'-GCCGCCACC-3') inmediatamente en orientación 5' del codón de inicio ATG.

[0283] Vectores de expresión a base de pTT fueron generados para expresión transitoria del anticuerpo TFPI4F36 humanizado como un isotipo de kappa/IgG4(S241P) humano. La mutación de prolina en la posición 241 (numeración de conformidad con Kabat, correspondiente al residuo 228 por el sistema de numeración EU (Edelman G. M. et al., Proc. Natl. Acad. USA 63, 78-85 (1969)) fue introducido en la región de gozne de IgG4 para eliminar la formación de fragmentos de anticuerpo monoméricos, es decir, "semi-anticuerpos" compuestos de un LC y un HC.

[0284] El fragmento VH fue cortado del vector de clonación GENEART y clonado en un vector a base de pTT linealizado que contenía la secuencia para el dominio CH de IgG4(S241P) humano subsecuentemente transformado en *E. coli* para selección. La secuencia del constructo final fue verificada por secuenciación de ADN. El fragmento de VL fue cortado del vector de clonación de GENEART y clonado en un vector a base de pTT linealizado que contenía la secuencia para un dominio CL Kappa humano y subsecuentemente transformado en *E. coli* para selección. La secuencia del constructo final fue verificada por secuenciación de ADN.

[0285] Secuencias de ácido nucleico u aminoácidos para VL, VH, LC y HC del anticuerpo monoclonal HzTFPI4F36 injertado con CDR (secuencia de péptido de señal omitida) se proveen en el listado de secuencias (SEC ID n.ºs: 26-30).

Generación de vectores de expresión para TFPI4F36 quiméricos de ratón/humano

[0286] Para permitir la mejor evaluación posible de las variantes de TFPI4F36 humanizada, una versión de quimera de ratón/humano del anticuerpo TFPI4F36 (ChimTFPI4F36) se construyó a fin de eliminar cualesquiera diferencias relacionadas con el origen de región constante e isotipo. Los vectores de expresión a base de pTT fueron generados para expresión transitoria de anticuerpo anti-TFPI4F36 quimérico con dominios variables de ratón sobre los armazones proteínicos de isotipo kappa/IgG4(S241P) humanos.

[0287] La región correspondiente al dominio VH fue amplificada por PCR a partir de un plásmido de expresión HC de anti-TFPI4F36A1B2 mediante el uso de un cebador específico de pTT y un cebador específico para el C-terminal del dominio VH. El cebador de sentido es específico para tramo de secuencia en orientación 5' del sitio de restricción HindIII y el codón de inicio ATG. El cebador de anti-sentido contenía un sitio de restricción NheI en marco en la secuencia de transición de VH/CH. El fragmento de PCR generado fue digerido por restricción, clonado en un vector a base de pTT linealizado que contenía la secuencia para un dominio de CH de IgG4(S241P) humano y subsecuentemente transformado en *E. coli* para selección. La secuencia del constructo final fue verificada por secuenciación de ADN.

[0288] La región correspondiente al dominio VL fue amplificada por PCR a partir de un plásmido de expresión LC de TFPI4F36A1B2 mediante el uso de un cebador específico de pTT genérico y un cebador específico para el C-terminal del dominio VL. El cebador de sentido es específico para el tramo de secuencia en orientación 5' del sitio de restricción HindIII y el codón de inicio ATG. El cebador anti-sentido contenía un sitio de restricción BsiWI en marco en la secuencia de transición de VL/CL. El fragmento de PCR generado fue digerido por restricción, clonado en un vector a base de pTT linealizado que contenía la secuencia para un dominio CL Kappa humano y subsecuentemente transformado en *E. coli* para selección. La secuencia del constructo final fue verificada por secuenciación de ADN.

Expresión recombinante de variantes de mAb

[0289] El anti-TFPI4F36A1B2 de ratón, anti-TFPI4F36 quimérico y variantes de anticuerpo TFPI4F36 humanizado se expresaron transitoriamente en células HEK293-6E al seguir un protocolo de expresión de anticuerpo genérico. El siguiente procedimiento describe el protocolo de transfección genérico usado para células HEK293-6E adaptadas por suspensión.

Mantenimiento de células

[0290] Células HEK293-6E se hicieron crecer en suspensión en un medio de expresión Freestyle™ 293 (Gibco) complementado con 25 µg/ml de Geneticin (Gibco), 0.1% v/v del agente tensioactivo Pluronic F-68 (Gibco) & 1% v/v de penicilina-estreptomicina (Gibco). Las células se cultivaron en matraces con agitador Erlenmeyer en incubadoras con agitador a 37°C, 8% de CO₂ y 125 rpm y se mantuvieron a densidades de células entre 0.1-1.5 x 10⁶ células/ml.

Transfección de ADN

[0291]

•La densidad de células de cultivos usados para la transfección fue 0.9-2.0 x 10⁶ células/ml.

•Una mezcla de 0.5 µg de ADN de vector LC + 0.5 µg de ADN de vector HC se usó por mililitro de cultivo de células.

•El ADN se diluyó en medio Opti-MEM (Gibco), 30µl medio/µg de DNA, mezclado e incubado a temperatura ambiente (23-25°C) durante 5 minutos.

•293Fectin™ (Invitrogen) se usó como reactivo de transfección a una concentración de 1 µl por µg de DNA.

•El 293Fectin™ se diluyó 30X en medio Opti-MEM (Gibco), mezclado e incubado a temperatura ambiente (23-25°C) durante 25 minutos.

•El ADN y soluciones de 293Fectin se mezclaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente (23-25°C) durante 25 minutos.

•La mezcla de ADN-293Fectin se añadió después directamente al cultivo de células.

•El cultivo de células transfectadas fue transferido a una incubadora con agitador a 37°C, 8 % de CO₂ y 125 rpm.

•3-6 días después de la transfección, los sobrenadantes de cultivo de células se cosecharon por centrifugación, seguido por filtración a través de un filtro de PES de 0.22 µm (Corning).

•Análisis cuantitativo de producción de anticuerpos se realizó por interferometría de biocapa directamente en sobrenadantes de cultivo de células clarificados mediante el uso del sistema Octet y biosensores de proteína A o HPLC de proteína A cuantitativo.

Análisis de actividad de la variante injertada con CDR de anti-TFPI4F36 humanizado

[0292] La humanización por injerto de CDR mínimo dio por resultado una pérdida drástica de afinidad causada por efecto tanto sobre la tasa de asociación como la tasa de disociación. La afinidad de unión de TFPI de la versión inicialmente injertada del anticuerpo anti-TFPI4F36 humanizado ((HzTFPI4F36-injertado con CDR, en la tabla 1 listada como TFPI4F36 humanizado) fue por lo menos 100 veces menor que ~30 pM de afinidad del anticuerpo TFPI4F36 de ratón original (véase tabla 1). La retención de afinidad en el anticuerpo quimérico confirmó que kappa/IgG4(S241P) humano no tuvo efecto sobre la afinidad del anticuerpo. Los análisis de afinidad se hicieron mediante el uso de SRP como se describe a continuación.

Tabla 1

mAb	ka (1/Ms)	kd (1/M)	KD (M)
TFPI4F36 de ratón	4.70E+06	1.33E-04	2.82E-11
TFPI4F36 quimérico	8.88E+06	1.44E-04	1.62E-11
TFPI4F36 humanizado	1.07E+06	2.21E-03	2.06E-09

Análisis de resonancia de plasmón de superficie (Biacore) de interacción hzTFPI4F36-TFPI

[0293] Los parámetros cinéticos para la interacción de TFPI humano recombinante al anti-TFPI4F36AIB2 de ratón original, anti-TFPI4F36 quimérico y varias variantes del anticuerpo TFPI4F36 humanizado se determinaron por análisis de SPR en Biacore, mediante el uso de dos enfoques diferentes. Estudios de categorización de cinética inicial se basaron en un procedimiento de captura de mAbs purificado como se describe en el ejemplo 1. Estos fueron seguidos por un procedimiento cinético de unión directa sobre constructos de mAb seleccionados, con el anticuerpo monoclonal covalentemente acoplado mediante grupos amina libres a la membrana de dextrano carboximetilada (CM5) en la superficie del chip sensor. El TFPI humano recombinante fue inyectado en varias concentraciones, seguido por un periodo de disociación con flujo de regulador de pH constante sobre la superficie del chip sensor como se describe en el ejemplo 8.

Mutagénesis dirigida al sitio para introducir retromutaciones en mAb humanizado

[0294] Basado en la afinidad baja de la versión injertada con CDR de anti-TFPI4F36 humanizado, una serie de 27 mutaciones inversas humano a ratón (denominadas retromutaciones) se generó en la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de HzTFPI4F36-injertado con CDR. Estas mutaciones fueron expresadas, purificadas y analizadas por Biacore, ya sea como mutantes separados o como mutantes de combinación de LH/HC. Las listas de mutaciones generadas se muestran en las tablas 2 y 3, respectivamente.

[0295] La mutagénesis dirigida al sitio se realizó para introducir mutaciones inversas humano a ratón (de aquí en adelante referidas como retromutaciones) en los residuos específicos en los constructos LH/HC de HzTFPI4F36-injertado con CDR como se resalta en el diseño de humanización. Las mutaciones fueron introducidas por dos métodos diferentes:

1) Kits de mutagénesis dirigida al sitio o dirigida a multisitios QuickChange® de Stratagene se usaron para introducir mutaciones puntuales y mutaciones de combinación. Los kits se usaron de conformidad con el protocolo del fabricante.

2) Métodos de PCR de solapar de 2 pasos estándares también se usaron para introducir mutaciones puntuales y para generar mutaciones de combinación.

Los plásmidos de expresión de LC y HC para HzTFPI4F36-injertado con CDR se usaron como plantillas para las primeras rondas de mutagénesis. En las rondas subsecuentes, las mutaciones también fueron introducidas mediante el uso de plásmidos previamente mutados como plantilla. Las secuencias de todos los constructos finales fueron verificadas por secuenciación de ADN.

Tabla 2: Variantes mutadas de cadena ligera de HzTFPI4F36-injertado con CDR

Mutantes de LC	Mutaciones	K _D (M)
HzTFPI4F36 LC-S63T	S63T	7.8E-9
HzTFPI4F36 LC-P15I	P15I	17.0E-9
HzTFPI4F36 LC-FR2	Y36L, K39R, Q42E, Q45K	6.3E-10
HzTFPI4F36 LC-P15I, FR2	P15I, Y36L, K39R, Q42E, Q45K	6.4E-10
HzTFPI4F36 LC-Y36L	Y36L	>3E-11
HzTFPI4F36 LC-K39R, Q42E, Q45K	K39R, Q42E, Q45K	>3E-11

Tabla 3: Variantes mutadas de la cadena pesada de HzTFPI4F36-injertada con CDR

Mutantes de HC	Mutaciones	K _D (M)
HzTFPI4F36 HC-Q3E	Q3E	5.8E-9
HzTFPI4F36 HC-G44R	G44R	2.3E-9
HzTFPI4F36 HC-S49A	S49A	3.0E-9
HzTFPI4F36 HC-Y59F	Y59F	5.5E-9
HzTFPI4F36 HC-A60P	A60P	2.2E-9
HzTFPI4F36 HC-K64Q	K64Q	2.5E-9

H _z TFPI4F36 HC- S77T	S77T	1.5E-9
H _z TFPI4F36 HC- A93T	A93T	2.7E-9
H _z TFPI4F36 HC- Y59F, A60P	Y59F, A60P	2.3E-9
H _z TFPI4F36 HC- KABAT CDR2	Y59F, A60P, K64Q	9.0E-10
H _z TFPI4F36 HC- FR2, S49A	A40T, G42E, G44R, S49A	1.3E-9
H _z TFPI4F36 HC- FR3	N82aS, A84S, V89M	5.3E-9
H _z TFPI4F36 HC- FR3, S77T	S77T, N82aS, A84S, V89M	7.7E-9
H _z TFPI4F36 HC- FR3, A93T	N82aS, A84S, V89M, A93T	4.1E-9
H _z TFPI4F36 HC- FR2	A40T, G42E, G44R	8.8E-10
H _z TFPI4F36 HC- FR2, S49A, CDR2	A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q	2.6E-11
H _z TFPI4F36 HC- G42E, G44R, CDR2	G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q	3.9E-11
H _z TFPI4F36 HC- FR2, CDR2	A40T, G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q	>3E-11
H _z TFPI4F36 HC- G42E, G44R, S49A CDR2	G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q	>3E-11
H _z TFPI4F36 HC- G42E, G44R, A60P, K64Q	G42E, G44R, A60P, K64Q	9.3E-11
H _z TFPI4F36 HC- G44R, A60P, K64Q	G44R, A60P, K64Q	3.0E-11

Las mutaciones tanto en LC como en HC como se lista en las tablas 2 y 3 numeradas consistentemente de conformidad con el esquema de numeración Kabat como se muestra en la figura 1.

[0296] Los mutantes de LC listados en la tabla 2 se expresaron como mutantes de LC sólo junto con HC H_zTFPI4F36-injertado con CDR de tipo silvestre. Los mutantes de HC listados en la tabla 3 se expresaron como mutantes de HC sólo junto con LC H_zTFPI4F36-injertado con CDR de tipo silvestre. Los mutantes de combinación de LC-HC también se expresaron al combinar diferentes mutantes de LC y HC. Los mutantes son nombrados consistentemente de acuerdo con la cadena mutada, es decir, la variante de mAAb humanizada final es expresada con LC de H_zTFPI4F36-injertado con CDR de tipo silvestre y el HC H_zTFPI4F36 **FR2, S49A, CDR2** mutado. La expresión de HEK293-6E transitoria se realizó como se describió anteriormente.

[0297] El conjunto inicial de 9 de mutantes puntuales (H_zTFPI4F36 LC-**S63T** y H_zTFPI4F36 HC-**Q3E; G44R; S49A; Y59F; A60P; K64Q; S77T; A93T**) se basó en un conjunto primario de retromutaciones resaltadas en el diseño de humanización. Ninguno de los mutantes puntuales rescató la afinidad del anticuerpo, sin embargo mutaciones en la segunda región de marco de trabajo de cadena pesada humana (FR2, entre CDR H1 y CDR H2) y en la región C-terminal de CDR H2 (omitida en el esquema de injerto de CDR mínimo) fueron resaltados como que eran importantes para unión a TFPI. Las mediciones de afinidad por análisis de Biacore se realizaron como se describió anteriormente.

[0298] Las rondas subsecuentes de mutagénesis incluyeron un número de mutantes de parche en los cuales todos los residuos en regiones individuales fueron mutados colectivamente. El mutante H_zTFPI4F36 HC-**Kabat CDR2**, tiene 3 mutaciones Y59F, A60P, K64Q en la región C-terminal de CDR H2, que corresponden a CDR H2 de injerto de conformidad con la definición de Kabat y no de conformidad con el esquema de injerto de CDR mínimo usado para la variante de H_zTFPI4F36-injertada con CDR inicial. Este mutante parchado junto con mutantes de parche en LC FR2 Y HC FR2 mejoraron la afinidad del anticuerpo TFPI4F36 humanizado significativamente, pero ninguno de los tres mutantes de parche individualmente restauró la afinidad de TFPI4F36 alta.

[0299] El mutante de HC con mutaciones combinadas en HC FR2 y CDR2 (A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q) restauró la afinidad por completo. Este mutante introdujo siete residuos de ratón adicionales en la secuencia de anticuerpo. La combinación de mutantes LC FR2 (ambas **mutaciones de FR2 y Y36L**) y mutantes HC FR2 y/o CDR2 también produjeron mutantes con alta afinidad. Sin embargo, la combinación de estos mutantes de LC/HC consistentemente produjeron rendimientos de expresión más bajos en comparación con las mutaciones de HC solas. Estos resultados indican que la inclusión de los mutantes de LC tuvo un impacto negativo sobre la estabilidad de estas variantes de anticuerpo, lo que sugiere que existe un patrón de interacción delicado entre TFPI4F36 LC y HC humanizado.

[0300] En la última serie de mutantes, las 7 mutaciones en HC FR2 y CDR2 (A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q) fueron disectadas a fin de eliminar retromutaciones potencialmente no contribuyentes. Una serie de 5 mutantes se generó para enfrentar este punto.

[0301] En tres mutantes, las retromutaciones fueron excluidas en FR2:

H_zTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, CDR2**
H_zTFPI4F36 HC-**FR2, CDR2**
H_zTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, S49A CDR2**

[0302] En 2 mutantes, mutaciones adicionales en CDR2 también fueron eliminadas:

H_zTFPI4F36 HC-**G44R, A60P, K64Q**
H_zTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, A60P, K64Q**

[0303] Ninguno de los mutantes sin embargo estuvo a la par con el mutante HC FR2 CDR2 combinado. Cualquier afinidad o niveles expresión (o ambos) fueron impactados por alguna reducción en el subconjunto de mutantes de HC FR2 CDR2. Los dos mutantes HzTFPI4F36 HC G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q con 5 retromutaciones restantes y HzTFPI4F36 HC G42E, G44R, A60P, K64Q con 4 retromutaciones residuales se recogieron para comparación completa con HzTFPI4F36 HC-**FR2, S49A, CDR2**.

○ HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, A60P, K64Q** y HzTFPI4F36 HC-**FR2, S49A, CDR2** fueron expresados a niveles comparables, mientras que HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, CDR2** tuvo un nivel de expresión ligeramente más bajo. Estudios de estabilidad biofísica acelerada no mostraron ninguna diferencia en estabilidad de las tres variantes.

○ Las afinidades medidas por Biacore se listan a continuación.

○ La eficacia *in vivo* medida en la prueba de dPT (como se describe más adelante) fue comparable para todas las tres variantes.

Tabla 4: Parámetros cinéticos para la interacción entre TFPI y variantes de TFPI4F36 humanizadas

Mutante	K _D (pM)	Rendimiento de expresión (mg/l)	N.º de retromutaciones
HzTFPI4F36 A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q	26	54	7
HzTFPI4F36 G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q	39	24	5
HzTFPI4F36 G42E, G44R, A60P, K64Q	93	53	4

[0304] Basado en los datos descritos anteriormente, el HC FR2 original y el mutante de CDR2 con 7 retromutaciones de HC (A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q) probaron ser superiores a otras variantes; esta variante se refiere aquí como HzTFPI4F36 o como mAbTFPI2021.

[0305] Es probable que las mutaciones de CDR2 Y59F, A60P, K64Q afecten la afinidad del anticuerpo al interactuar directamente con el antígeno. Las mutaciones A40T, G42E, G44R residen en una vuelta de FR2 que conecta a CDRH1 y CDR H2, remoto de la cara de unión del antígeno y podría ser equilibrado para estabilizar las interacciones de LC-HC. La mutación S49A es incrustada a la mitad de un agregado altamente hidrofóbico de cadenas laterales lo que podría explicar por qué la alanina es preferida sobre la serina en esta posición. Por lo tanto, de manera interesante, la alta afinidad de HzTFPI4F36 se obtiene como una combinación de mutaciones que mejoran la interacción de antígeno directa y mutaciones lejanas de la región de unión a antígeno que estabilizan el anticuerpo.

[0306] En conclusión, HzTFPI4F36 tiene una afinidad (K_D) de ~25 pM y contiene 35 residuos de aminoácidos derivados de la secuencia de anticuerpo de ratón, correspondiente a 5.2% del número total de residuos en el anticuerpo.

[0307] Las secuencias de aminoácidos para la región ligera variable (VL), región pesada variable (VH), cadena ligera y cadena pesada de un constructo humanizado seleccionado HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) se muestran en SEC ID n.ºs: 15, 18, 21 y 24, respectivamente.

Pruebas de eficacia in vitro

[0308] El anticuerpo anti-TFPI4F36 es capaz de neutralizar la inhibición mediada por TFPI neutralizante del factor de coagulación Xa (FXa) y el complejo del factor tisular (TF) y el factor VIIa (FVIIa). Las actividades de variantes de anticuerpo TFPI4F36 de ratón y humanizadas se midieron en una prueba de tiempo de protrombina diluida (dPT). La prueba de dPT se usó para medir la actividad procoagulante de anticuerpos anti-TFPI. El incremento en las concentraciones de plasma de anticuerpo anti-TFPI acorta el tiempo de coagulación de dPT.

Ejemplo 4: Purificación, cristalización y estructura del fragmento Fab de MuTFPI4F36 (Fab) y el segundo dominio de Kunitz (K2) del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano

[0309] Un fragmento de TFPI que incluía su segundo dominio de Kunitz (K2) y una His₆-tag C-terminal (SEC ID n.º: 2) fue co-cristalizado con el fragmento Fab de MuTFPI4F36 (Fab). La estructura del complejo se resolvió por cristalografía de rayos-X. El epítipo de unión de K2 se encontró que estaba compuesto de los residuos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 y L50. El parátipo en Fab se encontró que comprendía los residuos E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 y F99 de la cadena ligera de MuTFPI4F36 (SEC ID n.º: 4) y los residuos N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 y D106 de la cadena pesada de MuTFPI4F36 (SEC ID n.º: 8).

Materiales y métodos

Cromatografía de exclusión de tamaño analítica

5 [0310] Se realizó cromatografía de exclusión de tamaño analítica (SEC) mediante el uso de una columna Biosep S-3000 (300 x 7.80 mm) (Phenomenex) eluida con PBS-regulador de pH (10 mM fosfato, 150 mM NaCl, 3mM KCl, pH 7.5) a una velocidad de flujo de 0.8 ml/min.

Preparación y purificación del complejo Fab/K2

10 [0311] El complejo Fab/K2 se preparó al mezclar Fab (0.27 mg/ml en regulador de pH PBS, pH 7.4) y K2 (0.29 mg/ml en PBS, pH 7.4) en una relación molar de 1:1.5 (5.4 mg Fab y 1.4 mg K2). El complejo se concentró en un dispositivo de filtro de centrifuga (Amicon, 10 kD mw de corte) a una concentración de ~6.7 mg/ml. Para eliminar el exceso de K2, la muestra concentrada se aplicó a una columna de filtración de gel Superdex 75 (CV300) eluida con PBS-regulador de pH, pH 7.4, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones que
15 contenían el complejo Fab/K2 se pusieron en acervo y se concentraron a una concentración de proteína de 9.2 mg/ml. Esta solución se usó para cristalización.

Cristalización del complejo Fab/K2

20 [0312] El complejo Fab/K2 fue cristalizado como barras por el método de gota colgante mediante el uso de una solución precipitante que contenía citrato de potasio tribásico 0.2 M (pH 8.0) y 20% p/v de PEG 3,350.

Determinación de estructura de cristal

25 [0313] La estructura del complejo Fab/K2 se resolvió por el método de reemplazo molecular mediante el uso de estructuras de PDB 1F8T y 1TFX como plantillas para las moléculas Fab y K2, respectivamente.

Resultados

30 [0314] El complejo entre Fab y K2 se preparó al añadir exceso de K2 a una solución de Fab. La figura 6 muestra la formación de complejo monitoreada por cromatografía de exclusión de tamaño analítica (SEC). Este método separa moléculas de conformidad con el tamaño molecular donde las especies más grandes se eluyen más temprano que las más pequeñas. Los picos correspondientes a K2 y Fab fueron bien separadas debido a la gran diferencia en peso molecular (pm ~8 kDa y 48 kDa, respectivamente). La adición de K2 a la solución de Fab dio por resultado el cambio
35 menor esperado en la posición pico hacia tiempos de retención más cortos. El complejo fue fácilmente separado y obtenido en forma pura al separar el exceso de K2 mediante el uso de SEC preparativa.

[0315] Las condiciones para la cristalización del complejo Fab/K2 se seleccionaron mediante el uso de varios tamices de cristalización comerciales. El método de gota colgante dio cristales en forma de barra adecuados para análisis de rayos X de cristal individual y la estructura se resolvió por el método de reemplazo molecular mediante el uso de
40 estructuras depositadas en PDB como plantillas. La figura 7 muestra la estructura global del complejo Fab/K2. Se despliegan cadenas ligera y pesada, que constituyen la molécula de Fab, y que presentan el pliegue de β -sandwich de inmunoglobulina esperado característico para moléculas de anticuerpo. También se muestran los lazos de CDR que hacen contacto con el antígeno y que definen la especificidad y afinidad del anticuerpo.

45 [0316] El antígeno, K2, presenta la lámina β antiparalela individual característica (β 1 (I20-N26) y β 2 (P31-Y37)) y la hélice α N-terminal (α 1, L50-I56) que define el doblez de Kunitz (figura 8). También se presenta la hélice α 1 opcional cerca del N-terminal (α 0, D5-F8), seguido por el lazo a (L1, L9-Y19), que conduce a β 1, que está conectado a β 2 mediante un lazo corto (L β , N27-K30). En el segmento C-terminal, el lazo 2 (L2, G38-T49) conecta β 2 con α 1.
50 Finalmente, los tres enlaces de disulfuro característicos (C7-C57, C16-C40 y C33-C53) conectan α 0 con α 1, L1 con L2 y β 2 con α 1, respectivamente.

[0317] Dos estructuras de K2 han sido depositadas en el banco de datos de proteína a nivel mundial (PDB). Una estructura, 1ADZ, es determinada por espectroscopía de RMN y representa la estructura de solución libre, mientras que
55 la otra, 1TFX, es determinada por cristalografía de rayos X y representa K2 en complejo con tripsina de porcino. La figura 9 muestra la superposición estructural de K2 representada por 1ADZ, 1TFX y la molécula de K2 en complejo con Fab. Las trazas del esqueleto parecen ser muy similares entre todas las tres estructuras, lo que sugiere que el pliegue de Kunitz con sus tres enlaces de disulfuro estabilizadores es más bien rígido.

Descripción del epítipo de unión a K2 MuTFPI4F36

[0318] El epítipo de unión en el antígeno K2, definidos como residuos en K2, que contienen por lo menos un átomo pesado de cadena lateral situado dentro de una distancia de 4 Å o menos de un átomo pesado en Fab, comprende los
65 residuos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 y L50 (figuras 10A-10C. Los residuos de contacto en K2 están localizados en L1 (E10, E11, P13, R17, Y19), en la estructura de lámina β (T21, Y23, Q31, E33,

R34, F35, K36) y el lazo de conexión, L β (Q28) y finalmente, uno solo en α 1 (L50). Las figuras 10A-10C ilustran el epítipo de unión mapeado tanto en estructura 3D de K2 como en la secuencia de aminoácidos primaria.

Descripción de parátipo MuTFPI4F36

[0319] El parátipo en el fragmento Fab de MuTFPI4F36 se determinó a partir de la misma estructura de rayos X del complejo entre el Fab de MuTFPI4F36 y el dominio TFPI K2. El parátipo se definió como aquellos residuos en el Fab de MuTFPI4F36 que tiene un átomo pesado dentro de una distancia de menos de 4 Å de un átomo pesado en el dominio K2. Los residuos de contacto en la cadena ligera están localizados en los residuos E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 y F99 de la SEC ID n.º: 4. Los residuos de contacto en la cadena pesada están localizados en los residuos N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 y D106 de la SEC ID n.º: 8. La ubicación del parátipo se ilustra en la figura 3.

Ejemplo 5: Estructura del complejo K2/HzTFPI4F36 Fab

[0320] Al usar metodología similar a la descrita para la determinación de la estructura tridimensional de MuTFPI4F36 Fab unido a K2, la estructura del complejo entre el fragmento Fab del anticuerpo humanizado, HzTFPI4F36 y K2 se determinó. El Fab de HzTFPI4F36 se encontró esperadamente que se unía a la misma región de K2 que el Fab de ratón del cual se deriva. La similitud global entre las estructuras de los dos complejos es evidente en la figura 11, donde trazas de listón de esqueleto se solapan para los complejos K2/TFPI4F36 Fab y K2/HzTFPI4F36 Fab. El epítipo (definido mediante el uso de un corte de 4 Å) sobre K2 se encontró, para HzTFPI4F36, que comprendía los residuos de E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, P28, P31, C32, E33, R34, K36 y L50. En comparación con la estructura de K2/MuTFPI4F36 Fab de origen de ratón, D12, F24, N26 y C32 están en el complejo K2/HzTFPI4F36 humanizado dentro del corte 4 Å, mientras que F35 está en el exterior. Esto refleja diferencias menores en orientaciones de cadena lateral dentro de las interfaces de unión de complejos K2/MuTFPI4F36 Fab y K2/HzTFPI4F36 Fab, a pesar del hecho de que las regiones CDR en MuTFPI4F36 y HzTFPI4F36 son idénticas.

Ejemplos 6 a 8

[0321] La función de HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) se comparó con la función de todos (cuatro) los anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles, algunos de los cuales se dice que se unen al dominio de K2 de TFPI; algunos de los cuales no se han descrito con respecto a unión.

Ejemplo 6: Prueba de neutralización de TFPI: inhibición de Fxa

[0322] Los materiales usados fueron tampón BSA en prueba (50 mM de Hepes; 0.1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0.1 mg/ml BSA, pH 7.4) y los reactivos mostrados en la tabla 5.

Tabla 5: Materiales usados

Reactivo	Compañía/ Referencia	Conc. de abastecimiento	Concentración final (dilución en tampón BSA)
FXa humano	Enzyme Research Laboratory	21.7 μ l	5 nM
TFPI humano	Referencia: Pedersen et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, p. 16786-16793	Secado por congelamiento en 10 mM de glicilglicina, 100 mM de NaCl; 165 mM de manitol, regulador de pH a pH 7.0. Reconstituido en agua.	6 nM
mAbTFPI4F36 mAb0281 mAb4904 mAb2974 mAb29741	Presente invención Ab systems AD R&D systems R&D systems		5-150 nM
S2765	Chromogenix	20 mM	1 mM

Método:

[0323] TFPI humano de longitud completa recombinante (concentración final 6 nM)) se mezcló en tampón BSA con concentraciones cada vez mayores del mAb de interés (concentración final: 5-150 nM) durante 30 min. FXa se añadió y se incubó 30 min con la mezcla durante otros 30 min. El sustrato cromogénico S2765 se añadió y la absorción en 405 nm se midió durante 15 min en un Spectramax. 100% de actividad representa la actividad de FXa sin la adición de TFPI.

Tabla 6: Neutralización de inhibición por TFPI de FXa

Compañía	ID de mAb	IC ₅₀ nM	% de neutralización de TFPI a 150 nM
presente invención	H2TFPI4F36 (mAbTFPI2021)	12.6	100%
AbNova	mAb0281	nd	< 10%
American Diagnostica	mAb4904	nd	< 10%
R&Dsystems	mAb2974	29.4	90%
R&Dsystems	mAb29741	nd	< 10%

Conclusión:

[0324] A 150 nM, H2TFPI4F36 (mAbTFPI 2021) neutralizó completamente la inhibición por TFPI de FXa. Casi no se detectó actividad para mAb0281, mAb4904 y mAb29741.

Ejemplo 7: Prueba de neutralización de TFPI: inhibición de FVIIa/TF/Fxa

Los materiales usados fueron tampón BSA (50 mM de Hepes; 0.1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0.1 mg/ml de BSA, pH 7.4) EDTA: 50 mM y los reactivos listados en la tabla 7.

Tabla 7

Reactivo	Compañía/Referencia	Conc. de abastecimiento	Concentración final (diluido en regulador de pH de BSA)
MAB2974 mAbTFPI4F36	R&D systems <i>Presente invención</i>	3330 nM 75300 nM	Variable (5-150 nM)
NovoSeven	Novo Nordisk	27 µM	1 pM
Vesículas	HTI Phospholipids vesicles cat#PCPS-02 #W1115-75% PC - 25% PS	2.0 mM	10 µM
S-2765	Chromogenix	35 mM	0.5 mM
FX	American Diagnostica inc. Bovine factor X Producto no 510 Lote No. 050920 disuelto en 50% de glicerol/agua	165 µM	160 nM
TFPI	Referencia: Pedersen et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, p. 16786- 16793	18.6 µM	1 nM
TF (Innovin)	Dade Behring#2010-01-11# 536975 vial dis. en 10 ml de H2O	2.8 nM (6nM)	1 pM

Método:

[0326] Se añaden todos los componentes en las concentraciones finales indicadas en la tabla. Se añaden 25 µl de FX, 25 µl de TFPI mAb en concentraciones variables, 25 µl de TFPI humano, 25 µl de FVIIa-TF (innovina) en pozos de microtitulación. Incubación durante 40 min a temperatura ambiente. Se añaden 50 µl de EDTA seguido por 50 µl de S-2765. Se mezcla y se lee la placa durante 15 min a 405 nm en Spectramax. 100% de actividad es la actividad de FVIIa/TF/FX obtenido sin TFPI presente.

Tabla 8: Neutralización de inhibición por TFPI de FVIIa/TF/FX

Compañía	ID de MAb	IC ₅₀ nM	% de neutralización de TFPI a 150 nM
Presente invención	H2TFPI4F36 (mAbTFPI2021)	3.8 nM	100%
AbNova	mAb0281	nd	Nd
American Diagnostica	mAb4904	nd	Nd
R&Dsystems	mAb2974	45.6 nM	53%
R&Dsystems	mAb29741	nd	Nd

Conclusión:

[0327] A una concentración de mAb de 150 nM, TFPI es completamente neutralizado por mAbTFPI2021. mAb2974 también alcanza la saturación pero no neutraliza completamente TFPI (53% de neutralización).

Ejemplo 8: Análisis de interacción de unión

[0328] Los materiales usados fueron como se lista en la tabla 9.

Tabla 9

Reactivo	Compañía/ Referencia
TFPI humano	Secado por congelamiento en 10 mM de glicilglicina, 100 mM de NaCl; 165 mM de manitol, regulador de pH a pH 7.0. Reconstituido en agua.
MAbTFPI2021 mAb0281 mAb4904 mAb2974 mAb29741	Presente invención Ab systems AD R&D systems R&D systems
Todos los otros reactivos	Biacore

Método:

[0329] El análisis de interacción de unión se obtuvo por resonancia de plasmón de superficie en un instrumento Biacore T-100. La captura del anticuerpo monoclonal relevante a una concentración fija se obtuvo por inmovilización directa a un chip CM5 del mAb a un nivel de 500-1000 RU en 10 mM de acetato de sodio pH 4.5-5.0. Diluciones de cuatro veces de TFPI humano recombinante de longitud completa o forma corta de TFPI humano (1-161 residuos de aminoácidos) de 200 nM a 0.2 nM se probaron para unirse al mAb inmovilizado. Regulador de pH de acción y dilución: 10 mM de HEPES, 150 mM, 0.005% de p20, pH 7.4. La regeneración se obtuvo mediante 10 mM de Glicina, pH 1.7. La determinación de constantes cinética y de unión ($K_{\text{asociación}}$, $K_{\text{disociación}}$, K_D) se obtuvo al suponer una interacción 1:1 de TFPI y el anticuerpo de interés mediante el uso del software de evaluación Biacore T100. Los resultados se muestran en la tabla 10. La competencia de los mAbs diferentes para unirse a TFPI cuando se unen a mAbTFPI2021 ("mAb2021", HzTFPI4F36) se obtuvo por inmovilización de mAbTFPI2021 a 5000 RU a un chip CM5 seguido por unión de 50 nM de TFPI seguido al variar las concentraciones de mAbs (2974, 0281, 4904, 29741) que ha de ser probado para competencia. Los resultados se muestran en la tabla 11. La regeneración del chip se obtuvo por 10 mM de Glicina, pH 1.7.

Tabla 10: Análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Unión a TFPI humano de longitud completa. Constantes cinética y de unión

Productor	ID de mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	K_D
<i>Presente invención</i>	mAb2021	2.39E+06	3.58E-05	1.50E-11	0.015
AbNova	mAb0281	3.99E+05	0.001436	3.60E-09	3.60
American Diagnostica	mAb4904	1.42E+05	0.01294	9.14E-09	9.14
R&Dsystems	mAb2974	1.39E+06	0.001202	8.64E-10	0.864
R&Dsystems	mAb29741	9.51E+05	0.003165	3.33E-09	3.33

Tabla 11: Análisis de SPR. Constante de unión para unirse a TFPI humano de longitud completa y TFPI₁₆₁ (dominios K1 y K2). Competencia con mAbTFPI 2021

Productor	ID de mAb	K_D (M) TFPI	K_D (M) TFPI ₁₆₁	Competencia con mAb 4F36
<i>Presente invención</i>	mAbTFPI2021	1.50E-11	4.55E-11	Sí
AbNova	mAb0281	3.60E-09	7.28E-09	No
American Diagnostica	mAb4904	9.14E-09	Sin unión	No
R&Dsystems	mAb2974	8.64E-10	3.12E-09	Sí
R&Dsystems	mAb29741	3.33E-09	Sin unión	No

Conclusión

[0330] mAbTFPI2021 se une a TFPI con una afinidad mayor que cualquiera de los otros mAbs probados (K_D 15 pM). Sólo mAb2974 compete para unirse al mismo sitio que mAb TFPI4F36.

Ejemplo 9: Neutralización de TFPI sobre células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVECs)

[0331] Las células endoteliales constitutivamente expresan TFPI en una forma que es unida a la superficie de la célula mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). TFPI anclado con GPI específicamente inhibe actividad mediada por TF cuando TF se expresa en la misma célula como TFPI. Para demostrar que HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021) neutraliza la inhibición por TFPI unida a la célula mucho más eficientemente que mAb 2974 se aplicó a células endoteliales vasculares umbilicales humanas HUVECs; y para inducir expresión de TF, estas células fueron estimuladas con TNF α (Sigma RBI) y IL1 β (Roche) antes de probar para activación de FX catalizado por FVIIa/TF.

[0332] Células HUVEC se cultivaron a confluencia en placas de 96 pozos en medio EBM-2 (Clonetics) y se estimularon con 20 ng/ml de TNF α y 20 ng/ml de IL1 β durante 2 horas antes de probar. La prueba se realizó en 25 mM de HEPES, 137 mM de NaCl, 3.5 mM de KCl, 5 mM de CaCl₂, 1 mg/ml BSA (0.1%) pH 7.4, y activación de FX se siguió en presencia de anticuerpo (0-20 nM) y con adición de 50 pM de FVIIa y 50 nM de FX. La generación de FXa se midió con 0.6 mM de un sustrato cromogénico, S-2765 (Chromogenix) y se calibró hacia una curva estándar de FXa.

[0333] La figura 12 muestra los resultados cuando la inhibición por TFPI unido a células fue anulado por 0-20 nM de HzTFPI4F36 o mAb 2974. La activación de FX mediado por TF/FVIIa fue estimulada por HzTFPI4F36 con una concentración de efecto máximo, (EC_{50} ~nM) mientras que difícilmente cualquier estimulación de generación de FXa se observó con el 2974 mAb a 20 nM.

[0334] Por lo tanto, este ejemplo ilustra que HzTFPI4F36, contrario a mAb 2974, neutraliza eficientemente la inhibición de activación de FX mediada por TF/FVIIa por TFPI unido a células.

Ejemplo 10: Neutralización de inhibición por TFPI de actividad de TF/FVIIa sobre células de carcinoma de mama humano MDA-MB 231

[0335] Células MDA-MB 231 expresan constitutivamente altos niveles de TF y cantidades insignificantes de TFPI sobre la superficie. La activación de FX mediada por TF/FVIIa en la superficie celular puede ser inhibida por TFPI añadido exógeno. Para demostrar que H₂TFPI4F36 neutraliza este tipo de inhibición de TFPI mucho más eficientemente que mAb 2974 los inventores de la presente aplicaron células MDA-MB 231 y probaron la capacidad de varias concentraciones de anticuerpo para anular la inhibición por TFPI de activación de FX catalizada por FVIIa/TF.

[0336] Células MDA-MB 231 se cultivaron a confluencia en placas de 96 pozos en DMEM Gibco cat# 31966-021 suministrada con 10% de FCS y 1% de P/S. La prueba se realizó en 25 mM de HEPES, 137 mM de NaCl, 3.5 mM de KCl, 5 mM de CaCl₂, 1 mg/ml de BSA (0.1%) pH 7.4, y la activación de FX fue seguida en presencia de anticuerpo (0-20 nM) y con la adición de 2.5 nM de TFPI recombinante humano de longitud completa, 100 pM de FVIIa y 50 nM de FX. La generación de FXa se midió con 0.6 mM de un sustrato cromogénico, S-2765 (Chromogenix). La absorbancia a 405 nm se midió continuamente y la actividad de FXa se determinó al medir la pendiente de la curva de progreso a 15 min después del inicio de la reacción.

[0337] La figura 13 muestra los resultados cuando la inhibición por TFPI fue anulada por 0-20 nM de H₂TFPI4F36 o mAb 2974. La activación de FX mediada por TF/FVIIa fue estimulada por H₂TFPI4F36 con una concentración de efecto máximo medio, (EC₅₀ ~2 nM) mientras que la estimulación de la generación de FXa se obtuvo a una concentración sustancialmente más alta del 2974 mAb (EC₅₀ > 20 nM).

Ejemplo 11: Mapeo de los epítomos de unión de los anticuerpos monoclonales anti-TFPI, H₂TFPI4F36 y mAb2974, mediante el uso de ELISA

[0338] El epítipo de unión para H₂TFPI4F36 sobre TFPI-dominio 2 de Kunitz (K2) ha sido mapeado al resolver la estructura de cristal del complejo TFPI-K2/H₂TFPI4F36. El efecto de mutar residuos de aminoácidos individuales en TFPI centro (E10, R17 y Y19) y fuera (D5) del epítipo de unión para H₂TFPI4F36 sobre la afinidad de unión a H₂TFPI4F36 y mAb2974 (R&D systems) fue analizado por ELISA. Las variantes de TFPI fueron expresadas en células HEK293-F y las ELISAs se llevaron a cabo mediante el uso del medio acondicionado de los cultivos de células.

[0339] Las concentraciones de mutantes de TFPI-WT y TFPI fueron estimadas por una ELISA, que une TFPI Kw (MAb4903, American Diagnostica) y K3 (MAb4F110, en el laboratorio) y por lo tanto no es afectada por las mutaciones. El efecto de las mutaciones sobre la unión a H₂TFPI4F36 fue analizado mediante el uso de MAb4903 y H₂TFPI4F36 en la ELISA. El efecto sobre la unión a MAb2974 se determinó mediante el uso de una ELISA con MAb2974 y MAb4F110.

[0340] Los efectos de las mutaciones en TFPI-Kunitz 2 sobre la unión a H₂TFPI4F36 y MAb2974 respectivamente, se calcularon en relación con TFPI-WT (100% de unión) y se ilustró en la figura 14. Los números han sido corregidos para diferencias en los niveles de expresión.

Conclusión:

[0341] La mutación de alanina de los tres residuos de aminoácidos dentro del epítipo de unión para H₂TFPI4F36 dio por resultado unión reducida a H₂TFPI4F36, mientras que la sustitución de alanina del residuo localizado fuera del epítipo (TFPI-D5A) no tuvo efecto. Sólo uno de los cuatro mutantes de alanina, TFPI-Y19A, había reducido la unión a MAb2974.

[0342] En conclusión, H₂TFPI4F36 y MAb2974 tienen epítomos de unión distintos pero solapables localizados en TFPI-Kunitz 2.

Ejemplo 12: Estudios *in vivo*

[0343] Los conejos se hicieron transitoriamente hemofílicos mediante la administración intravenosa de 2000 RBU/kg de anticuerpos monoclonales anti-FVIII. Después de 10 minutos, los conejos recibieron 12000 U/kg de anticuerpo anti-TFPI (4F36; 1.93 mg/kg). El sangrado de la cutícula fue inducido 45 minutos después de la administración de anticuerpo anti-FVIII.

[0344] El anticuerpo 4F36 causó una reducción significativa en el tiempo de sangrado de la cutícula (figura 15). La administración del anticuerpo 4F36 condujo a caída no significativa en el número de plaquetas (figura 18).

[0345] Se repitió un experimento similar en el cual tres grupos de ocho conejos transitoriamente hemofílicos recibieron bien anticuerpo de control de isotipo (grupo de control negativo), 2 mg/kg de anti-TFPI (mAb 4F36) o bien 9 mg/kg de NovoSeven (grupo de control positivo) 5 minutos después de que el sangrado de la cutícula fuera inducido. Los resultados se ilustran en la figura 16: la administración de mAb 4F36 dio por resultado una reducción considerable en pérdida de sangre (aproximadamente 85%) en todos los receptores, lo que demuestra que mAb4F36 se puede usar "bajo demanda".

Ejemplo 13: Estimación de la relación de dosis-efecto en conejo

[0346] La relación de dosis-efecto del mAb HZTFPI4F36 humanizado se examinó en un modelo de hemofilia en conejo. Los conejos se hicieron hemofílicos transitorios mediante administración iv de un anticuerpo monoclonal anti-FVIII. Después de 10 minutos, los conejos recibieron 0.5, 1, 2 mg/kg HZTFPI4F36 o un anticuerpo de control de isotipo. Después de otros 35 minutos, el sangrado de la cutícula fue inducido, seguido por un período de observación de 60 minutos. HZTFPI4F36 redujo significativamente y de manera dependiente de la dosis el tiempo de sangrado así como la pérdida de sangre cuando se incrementa la dosis de 0.5 a 2 mg/kg (figura 17). Por lo tanto, una reducción significativa tanto del tiempo de sangrado como de la pérdida de sangre se logró con 1 mg/kg de HZTFPI4F36, en correspondencia a una concentración en el plasma de 18780 ng/ml HZTFPI4F36. La normalización del sangrado se logró a 2 mg/kg, en correspondencia a una concentración en el plasma de 30980 ng/ml de HZTFPI4F36.

[0347] Estos datos indican que la 'concentración eficaz', p. ej., la concentración en el plasma, necesaria para normalización en el presente modelo - de HZTFPI4F36 está en el intervalo de 18780 y 30980 ng/ml.

15 **Ejemplo 14: PK/PD en conejos – 'Duración de acción'**

[0348] Se realizó un estudio farmacocinético de HZTFPI4F36 en conejos dosificados con 20 mg/kg. En puntos de tiempo predeterminados durante el estudio, se extrajeron muestras de sangre de los conejos para perfil farmacocinético por una ELISA que medía HZTFPI4F36 libre (mostrado en las figuras 3A-3B más adelante). Se realizaron estudios de efecto a 4 días (96 horas), 7 días (168 horas) y 10 días (240 horas) después de la administración, mediante el uso del modelo de sangrado de la cutícula en conejos hemofílicos transitorios, los puntos de tiempo del efecto se indican en la figura 19.

[0349] El perfil farmacocinético es bifásico indicativo de aclaración mediado por el objetivo. Por lo tanto, por arriba del pliegue de la curva exceso de mAb libre está presente ($mAb_{libre} > TFPI_{total}$), por abajo del pliegue: $mAb_{libre} < TFPI_{total}$. De conformidad con el perfil farmacocinético, tanto el tiempo de sangrado como la pérdida de sangre fueron significativamente reducidos a 4 y 7 días después de la administración de 20 mg/kg de HZTFPI4F36 por vía intravenosa, mientras que no se observó efecto significativo después de 10 días (figura 20).

[0350] Estos datos confirman que la concentración eficaz en el plasma de HZTFPI4F36 en un modelo de sangrado de cutícula en conejos hemofílicos es entre 18780 y 30980 ng/ml que está cerca del límite de saturación de TFPI (pliegue de la curva). Por consiguiente, una sola dosis iv. de 20 mg/kg HZTFPI4F36 redujo el sangrado de la cutícula por lo menos durante 7 días, que corresponde al período que la concentración en el plasma estuvo por encima de la 'concentración eficaz'

35 **Ejemplo 15: Modelo farmacocinético basado en datos de PK en mono**

[0351] Se hizo una evaluación farmacocinética con base en un estudio farmacocinético en monos, donde se administraron tanto dosis individuales como dosis múltiples (figura 21). Los niveles de dosis variaron de 2 a 200 mg/kg.

[0352] El perfil de PK en monos (20 mg/kg, panel superior) es similar al de conejo que indica la presencia de distribución similar de TFPI soluble y unido a endotelio. Por lo tanto, estos datos indican que los datos de efecto de conejo se pueden utilizar para predecir el intervalo de efecto en mono. Además, la afinidad de HZTFPI4F36 para TFPI de humano, mono y conejo son similares (el mismo epítipo) y la distribución similar de TFPI en tejido en las tres especies permite predicciones de dosis en mono y el hombre.

45 **Ejemplo 16: Simulaciones**

[0353] Con base en el modelo presentado anteriormente, fue posible hacer una serie de simulaciones. El objetivo principal de las simulaciones fue describir el régimen de dosis óptimo en una situación de dosis múltiple. Esta concentración de objetivo (TFPI) no se conocía, pero los datos de efecto en conejo anteriores permiten la suposición de que si el objetivo está cerca de la saturación a un nivel de 30000 ng/ml, entonces se obtiene el efecto completo en un modelo de sangrado. Por lo tanto, el objetivo principal de las simulaciones fue evaluar cuáles niveles de dosis durante un período conducirían a saturación completa. La figura 22 despliega una simulación de 1 mg/kg administrado subcutáneamente. La figura 23 muestra una simulación de 15 mg/kg de HZTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) administrado IV cada tres semanas. La figura 24 muestra una simulación de 20 mg/kg de HZTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) administrada IV cada dos semanas.

[0354] En resumen, con base en las simulaciones anteriores, se puede hacer la siguiente predicción de régimen de dosis para seres humanos:

Tabla 12: Régimen de dosis

Tipo de dosis	Dosis	Régimen de dosis
Administración s.c.	1 mg/kg	Cada dos días
Administración i.v.	10-20 mg/kg	Cada dos y cuatro semanas

5 LISTA DE SECUENCIAS
[0355]
<110> Novo Nordisk Novo Nordisk A/S
10 <120> Anticuerpos
<130> 7788
<160> 34
15 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 276
20 <212> PRT
<213> *Homo Sapiens*
<400> 1
25

ES 2 458 665 T3

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
20 25 30

Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
35 40 45

Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
50 55 60

Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
65 70 75 80

Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe
85 90 95

Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg
100 105 110

Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly
115 120 125

Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
130 135 140

Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly
145 150 155 160

Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys
165 170 175

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro

ES 2 458 665 T3

180

185

190

Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn
195 200 205

Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly
210 215 220

Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
225 230 235 240

Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys
245 250 255

Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe
260 265 270

Val Lys Asn Met
275

5 <210> 2
<211> 66
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Constructo artificial usado para mapeo de epítipo
<400> 2

ES 2 458 665 T3

Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys
1 5 10 15

Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys
20 25 30

Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu
35 40 45

Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly His His His His
50 55 60

His His
65

<210> 3
<211> 339
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 3

10

gatattgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcttcc 60
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gaaagtgatg gaaaaaccta tttaaattgg 120
ttattacaga ggccaggcga gtctccaaag ctctaatct atctgggtgc tatactggac 180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac gctgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattggt tgcaagctac acattttcct 300
cagacgttcg gtggcggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

15

ES 2 458 665 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Glu Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 5
<211> 339
5 <212> ADN
<213> *Mus musculus*
<400> 5

10

ES 2 458 665 T3

ccgtttgatt tccagcttgg tgccgccacc gaacgtctga ggaaaatgtg tagcttgcaa	60
acaataataa actcccaaat cctcagcctc cactctgctg attttcagcg tgaaatctgt	120
ccctgatcca ctgccagtga acctgtcagg gactccagag tccagtatag acaccagata	180
gattaggagc tttggagact cgcttggcct ctgtaataac caatttaaata aggtttttcc	240
atcactttct aagaggctct gacttgactt gcaagagatg gaagctgggt gtccaatggt	300
aaccgacaaa gtgagtggag tctgggtcat cacaatatc	339

5 <210> 6
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 6

ES 2 458 665 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Glu Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

215

<210> 7

<211> 363

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

ES 2 458 665 T3

<400> 7

gaggtggagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcc a tgtcttgggt tcgccagact	120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtcgta gtggtagtta ctctacttt	180
ccagacagtg tgcagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgcg gtctgaggac acggccatgt attattgtac aagacttggg	300
ggttacgacg agggggatgc tatggactcc tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc	360
tca	363

5

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 8

ES 2 458 665 T3

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Phe Pro Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 9
<211> 363
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 9

tgaggagacg gtgactgagg ttccttgacc ccaggagtcc atagcatccc cctcgtcgta 60
acccccaagt cttgtacaat aatacatggc cgtgtcctca gaccgcagac tgctcatttg 120
caggtacagg gtgttcttgg cattgtctct ggagatgggtg aatcgaccct gcacactgtc 180
tggaagtag gagtaactac cactacgact aatgggttgcg acccactcca gcctcttctc 240
cggagtctgg cgaacccaag acatggcata gttactgaaa gtgaatccag aggctgcaca 300
ggagagtctc agggaccctc caggcttcac taagcctccc ccagactcca ccagctccac 360
ctc 363

ES 2 458 665 T3

<210> 10
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 10

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Phe Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

10

ES 2 458 665 T3

145		150		155		160
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala						
	165			170		175
Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro						
	180		185		190	
Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro						
	195		200		205	
Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly						
	210		215		220	
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile						
	225		230		235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys						
	245		250		255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln						
	260		265		270	
Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln						
	275		280		285	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu						
	290		295		300	
Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg						
	305		310		315	320
Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys						
	325		330		335	
Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro						
	340		345		350	
Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr						
	355		360		365	
Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln						
	370		375		380	
Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly						
	385		390		395	400
Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu						

ES 2 458 665 T3

405

410

415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

5 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador
<400> 11

cccttgacca ggcattcccag 20

15 <210> 12
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador
<400> 12

25 gctctagact aacactcatt cctgttgaag ctcttg 36

30 <210> 13
<211> 339
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cadena ligera variable humanizada
<400> 13

gacatcgtga tgaccagac cctctgtcc ctgtccgtga ccctggcca gectgcctcc 60
atctcctgca agtcctccca gtccctgctg gaatccgacg gcaagaccta cctgaactgg 120
tatctgcaga agcctggcca gtccctcag ctgctgatct acctgggtgc catcctggac 180
tccggcgtgc ctgaccggtt ctccggctcc ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgggtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tgcaggccac ccacttcct 300
cagacctttg gcggcggaac aaaggtggag atcaagcgt 339

ES 2 458 665 T3

<210> 14
 <211> 339
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cadena ligera variable humanizada

 10 <400> 14

 ctgtagcact actgggtctg gggagacagg gacaggcact ggggaccggt cggacggagg 60
 tagaggacgt tcaggaggggt caggggacgac cttaggctgc cgttctggat ggacttgacc 120
 atagacgtct tcggaccggt caggggagtc gacgactaga tggaccacag gtaggacctg 180
 aggccgcacg gactggccaa gaggccgagg ccgtcgccgt ggctgaagtg ggacttctag 240
 agggcccacc tccggctcct gcacccgcac atgatgacgg acgtccggtg ggtgaaggga 300
 gtctggaaac cgccgccttg tttccacctc tagttcgca 339

 15 <210> 15
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Cadena ligera variable humanizada

 <400> 15

 25

ES 2 458 665 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

- <210> 16
- 5 <211> 363
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Cadena pesada variable humanizada
- <400> 16

ES 2 458 665 T3

gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggcgga ctggtgaagc ctggcggctc cctgcggetg 60
tcttgcgctg cctccggctt caccttctcc aactacgcca tgtcctgggt gcggcagacc 120
ccagaaaagc ggctggaatg ggtggccacc atctcccgtt ccggtccta ctctacttc 180
cctgactccg tgcagggcgc gtccaccatc agcagggaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgag agccgaggac acagccgtgt actactgcgc caggctgggc 300
ggctacgacg agggcgacgc catggacagc tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtcc 360
tcc 363

<210> 17
<211> 363
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada variable humanizada
<400> 17

ctccacgtcg accagctcag accgcgcct gaccacttcg gaccgccgag ggacgccgac 60
aggacgcgac ggaggccgaa gtggaagagg ttgatgcggt acaggacca cgccgtctgg 120
ggtcttttcg ccgaccttac ccaccggtgg tagagggcca ggccgaggat gaggatgaag 180
ggactgagge acgtcccggc caagtggtag tcgtccctgt tgcggttctt gagggacatg 240
gacgtctact tgagggactc tcggctcctg tgcggcaca tgatgacgcg gtccgaccgc 300
ccgatgctgc tcccgtgcg gtacctgtcg accccggtcc cgtggtggca ctggcacagg 360
agg 363

<210> 18
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada variable humanizada
<400> 18

ES 2 458 665 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Phe Pro Asp Ser Val

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

- <210> 19
- <211> 657
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Cadena ligera constante humanizada
- <400> 19

ES 2 458 665 T3

gacatcgtga tgacccagac ccctctgtcc ctgtccgtga cccctggcca gcctgcctcc	60
atctcctgca agtcctccca gtccctgctg gaatccgacg gcaagaccta cctgaactgg	120
tatctgcaga agcctggcca gtccctcag ctgtgatct acctgggtgc catectggac	180
tccggcgtgc ctgaccggtt ctccggtcc ggcagcgga ccgacttcac cctgaagatc	240
tcccggtgg aggcgagga cgtggcgctg tactactgcc tgcaggccac ccacttcct	300
cagaccttg gcggcggaac aaaggtggag atcaagcgta cgggtggtgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg	420
ctgaalaact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa	480
tccggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa	600
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt	657

<210> 20
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera constante humanizada

<400> 20

ctgtagcact actgggtctg gggagacagg gacaggcact ggggaccggt cggacggagg	60
tagaggacgt tcaggagggg cagggacgac cttaggctgc cgttctggat ggacttgacc	120
atagacgtct tcggaccggt caggggagtc gacgactaga tggaccacag gtaggacctg	180
aggccgcacg gactggccaa gaggccgagg ccgtcgccgt ggctgaagtg ggacttctag	240
agggcccacc tccggctcct gcaccgcac atgatgacgg acgtccggtg ggtgaaggga	300
gtctggaaac cgccgccttg tttccacctc tagttcgcat gccaccgacg tggtagacag	360
aagtagaagg gcggtagact actcgtcaac tttagacctt gacggagaca acacacggac	420
gacttattga agatagggtc tctccggttt catgtcacct tccacctatt gcgggaggtt	480
agccattga gggtcctctc acagtgtctc gtctgtcgt tctgtcgtg gatgtcggag	540
tcgtcgtggg actgcgactc gtttcgtctg atgtctttt tgtttcagat gcggacgctt	600
cagtgggtag tcccgactc gagcgggcag tgtttctcga agttgtcccc tctcaca	657

ES 2 458 665 T3

<210> 21
 <211> 219
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cadena ligera constante humanizada

 10 <400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

ES 2 458 665 T3

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

- <210> 22
- 5 <211> 1344
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Cadena pesada constante humanizada
- <400> 22

ES 2 458 665 T3

gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggcgga ctggtgaagc ctggcggctc cctgcggctg 60
 tcttgcgctg cctccggctt caccttctcc aactacgcca tgtcctgggt gggcagacc 120
 ccagaaaagc ggctggaatg ggtggccacc atctcccggt ccggtccta ctectacttc 180
 cctgactcgc tgcagggccg gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgag agccgaggac acagccgtgt actactgcgc caggctgggc 300
 ggctacgacg agggcgacgc catggacagc tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtcc 360
 tccgctagca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420
 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600
 acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
 tccaaatatg gtcccccacg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 720
 gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccgac ccctgaggtc 780
 acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840
 gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgcgaagg tctccaacaa aggcctcccg tctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggt ctttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260
 gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag 1320
 agcctctccc tgtctctggg taaa 1344

5 <210> 23
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada constante humanizada

ES 2 458 665 T3

<400> 23

```

ctccacgtcg accagctcag accgccgcct gaccacttcg gaccgccgag ggacgccgac      60
aggacgcgac ggaggccgaa gtggaagagg ttgatgcggt acaggacca cgccgtctgg      120
ggtcttttcg ccgaccttac ccaccggtgg tagagggcca ggccgaggat gaggatgaag      180
ggactgaggc acgtcccggc caagtggtag tcgtccctgt tgcggttctt gagggacatg      240
gacgtctact tgagggactc tcggctcctg tgcgggcaca tgatgacgcg gtccgacccg      300
ccgatgctgc tcccgtctgc gtacctgtcg accccgggtcc cgtggtggca ctggcacagg      360
aggcgatcgt ggttcccggg taggcagaag ggggaccgcg ggacgaggtc ctctgtggagg      420
ctctcgtgtc ggccgggacct gacggaccag ttctgatga aggggcttgg ccactgccac      480
agcaccttga gtccgcggga ctggtcgccg cacgtgtgga agggccgaca ggatgtcagg      540
agtcttgaga tgagggagtc gtgcaccac tggcacggga ggtcgtcgaa cccgtgcttc      600
tgatgtgga cgttgcatct agtggtcggg tcgttgtggt tccacctgtt ctctcaactc      660
aggtttatac cagggggtac ggggtgtacg ggtcgtggac tcaaggacct ccttggtagt      720
cagaaggaca agggggggtt tgggttcctg tgagagtact agagggcctg gggactccag      780
tgcacgcacc accacctgca ctcggtcctt ctggggctcc aggtcaagtt gaccatgcac      840
ctaccgcacc tccacgtatt acggttctgt ttccggcggc tctcgtcaa gttgtcgtgc      900
atggcacacc agtcgcagga gtggcaggac gtggtcctga ccgacttgcc gttcctcatg      960
ttcacgttcc agaggttggt tccggagggc aggaggtagc tcttttggtg gaggtttcgg     1020
tttcccgctc gggctctcgg tgtccacatg tgggacgggg gtagggctct cctctactgg     1080
ttcttggtcc agtcggactg gacggaccag tttccgaaga tggggtcgct gtagcggcac     1140
ctcacctctc cgttaccctg cggcctcttg ttgatgttct ggtgcggagg gcacgacctg     1200
aggctgccga ggaagaagga gatgtcgtcc gattggcacc tgttctcgtc caccgtcctc     1260
cccttacaga agagtaagag gcactacgta ctccgagacg tggttggtgat gtgtgtcttc     1320
tcggagaggg acagagacct attt                                             1344

```

5 <210> 24
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada constante humanizada

ES 2 458 665 T3

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Phe Pro Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

ES 2 458 665 T3

210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	245	250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
	260	265 270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	275	280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
	290	295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
	325	330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	340	345 350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	355	360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	370	375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	405	410 415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	420	425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440 445

<210> 25

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico de VL HzTFPI4F36-injertado con CDR (secuencia de péptido de señal omitida)

5 <400> 25

gacatcgtga tgaccagac ccctctgtcc ctgtccgtga cccctggcca gcctgcctcc	60
atctcctgca agtcctccca gtccctgctg gaatccgacg gcaagaccta cctgaactgg	120
tatctgcaga agcctggcca gtccctcag ctgtgatct acctgggtgc catcctggac	180
tccggcgtgc ctgaccggtt ctccggctcc ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc	240
tcccgggtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgcc tgcaggccac ccacttcct	300
cagacctttg gcggcggaac aaaggtggag atcaagcgt	339

<210> 26

10 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos de VL HzTFPI4F36-injertado con CDR (secuencia de péptido de señal omitida)

<400> 26

ES 2 458 665 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

- 5 <210> 27
<211> 363
<212> ADN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de VH HzTFPI4F36-injertado con CDR (secuencia de péptido de señal omitida)
- <400> 27

ES 2 458 665 T3

```

gaggtgcagc tggtegagtc tggcggcgga ctggtgaagc ctggcggtc cctgcggctg      60
tcctgcgctg cctccggett caccttctcc aactacgcca tgtcctgggt gcggcaggcc      120
ccaggggaagg gactggaatg ggtgtccacc atctcccggt ccggctccta ctctactac      180
gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa ctccctgtac      240
ctgcagatga actccctgag agccgaggac acagccgtgt actactgcgc caggctgggc      300
ggctacgacg agggcgacgc catggacagc tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtcc      360
tcc                                                                           363

```

- 5 <210> 28
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de VH HzTFPI4F36-injertado con CDR (secuencia de péptido de señal omitida)
- <400> 28

ES 2 458 665 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de LC de HzTFPI4F36-injertado con CDR, cadena kappa humana (secuencia de péptido de señal omitida)

<400> 29

15

ES 2 458 665 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 30

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de HC de HzTFPI4F36-injertado con CDR, IgG4(S241P) humana (secuencia de péptido de señal omitida)

5

<400> 30

ES 2 458 665 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

ES 2 458 665 T3

210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	245	250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
	260	265 270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	275	280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
	290	295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
	305	310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
	325	330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	340	345 350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	355	360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	370	375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	385	390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	405	410 415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	420	425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440 445

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

ES 2 458 665 T3

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Ile His Leu Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

10

<400> 32

ES 2 458 665 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 33

<211> 224

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 33

ES 2 458 665 T3

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Phe Pro Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
210 215 220

<210> 34

<211> 222

<212> PRT

5 <213> *Homo Sapiens*

ES 2 458 665 T3

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Tyr Phe Pro Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Gly Tyr Asp Glu Gly Asp Ala Met Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse específicamente al dominio de K2 de inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde dicho anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un epítipo que comprende el residuo R17 de SEC ID n.º: 2 y el KD de dicho anticuerpo es menos de 0.8 nM, como se determina usando resonancia de plasmon de superficie.
2. Anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse específicamente al dominio de K2 de inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde dicho anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo que comprende E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, F35, K36 y L50 de SEC ID n.º: 2.
3. Anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 1 o 2, donde el KD de dicho anticuerpo es menor de 0.7 nM, tal como menos de 0.6 nM, tal como menos de 0.5 nM, tal como menos de 0.4 nM, tal como menos de 0.3 nM, tal como menos de 0.2 nM, tal como menos de 0.1 nM, tal como menos de 0.05 nM, tal como menos de 0.025 nM como se determina usando resonancia de plasmon de superficie.
4. Anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1-3, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende residuos de aminoácidos:
- E, en la posición correspondiente a la posición 31,
 - S, en la posición correspondiente a la posición 32,
 - D, en la posición correspondiente a la posición 33,
 - Y, en la posición correspondiente a la posición 37,
 - A, en la posición correspondiente a la posición 96,
 - T, en la posición correspondiente a la posición 97 y
 - F, en la posición correspondiente a la posición 99
- de SEC ID n.º: 15;
- y donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende residuos de aminoácidos:
- N, en la posición correspondiente a la posición 31,
 - R, en la posición correspondiente a la posición 53,
 - S, en la posición correspondiente a la posición 54,
 - Y, en la posición correspondiente a la posición 57,
 - Y, en la posición correspondiente a la posición 59,
 - F, en la posición correspondiente a la posición 60,
 - P, en la posición correspondiente a la posición 61,
 - D, en la posición correspondiente a la posición 62,
 - Q, en la posición correspondiente a la posición 65,
 - Y, en la posición correspondiente a la posición 102,
 - D, en la posición correspondiente a la posición 103 y
 - D, en la posición correspondiente a la posición 106
- de SEC ID n.º 18.
5. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 4, donde dicha cadena pesada además comprende una S en la posición correspondiente a la posición 52 de SEC ID n.º: 18 y/o donde la cadena ligera además comprende una H en la posición correspondiente a la posición 98 de SEC ID n.º: 15 y la cadena pesada además comprende una S en la posición correspondiente a la posición 56 de SEC ID n.º: 18.
6. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente.
7. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende:
- una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18, donde uno de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o
- y la cadena ligera de ese anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15, donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15, donde uno o dos de estos aminoácidos pueden ser sustituidos con un aminoácido diferente.
8. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, donde dicha sustitución de aminoácido es una sustitución conservativa.
9. Anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al dominio de Kunitz 2 (K2) del inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI), donde la cadena pesada de ese anticuerpo comprende:
- una secuencia CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) de SEC ID n.º: 18 y
 - una secuencia CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) de SEC ID n.º: 18 y
 - una secuencia CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) de SEC ID n.º: 18
- y donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende:
- una secuencia CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) de SEC ID n.º: 15; y
 - una secuencia CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) de SEC ID n.º: 15; y
 - una secuencia CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) de SEC ID n.º: 15.
10. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende SEC ID n.º: 15 y la cadena pesada de ese anticuerpo comprende SEC ID n.º: 18.
11. Un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la cadena ligera de ese anticuerpo comprende SEC ID n.º: 21 y la cadena pesada de ese anticuerpo comprende SEC ID n.º: 24.
12. Un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es capaz de neutralizar la inhibición por TFPI de FVIIa/TF/FXa unido a membrana en por lo menos 55%, tal como por lo menos 60%, tal como por lo menos 65%, tal como por lo menos 70%, tal como por lo menos 75%, tal como por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, tal como por lo menos 90%, tal como por lo menos 95%, tal como hasta 100%, tal como 100%, como se mide en una prueba de inhibidor de FVIIa/TF/FXa, cuando TFPI es saturado con el anticuerpo.
13. Célula eucariótica que expresa el anticuerpo monoclonal, o fragmento de este, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
14. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
15. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para uso en el tratamiento de un sujeto con coagulopatía.
16. Anticuerpo monoclonal para uso según la reivindicación 15, donde dicho sujeto tiene coagulopatía congénita, adquirida o iatrogénica, tal como hemofilia A, con o sin inhibidores, hemofilia B, con o sin inhibidores.

FIGURA 1

TFPI-4F36A1B2 VL (secuencia de nucleótidos y traducida, péptido de señal omitido):

```

      D I V M T Q T P L T L S V T I G Q .
1  GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCACT TTGTGGGTTA CCATTGGACA
   CTATAACACT ACTGGGCTCG AGGTGAGTGA AACAGCCAAT GGTAACCTGT
   . P A S I S C K S S Q S L L E S D G .
51 ACCAGCTTCC ATCTCTTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA GAAAGTGATG
   TGGTCGAAGG TAGAGAACGT TCAGTTCAGT CTCGGAGAAT CTTTCACTAC
   . K T Y L N W L L Q R P G E S P K
101 GAAAAACCTA TTAAATTTGG TTATTACAGA GGCCAGGCGA GTCTCCAAAG
   CTTTTTGGAT AAATTTAACC AATAATGTCT CCGGTCCGCT CAGAGGTTTC
   L L I Y L V S I L D S G V P D R F .
151 CTCCTAATCT ATCTGGTGTC TATACTGGAC TCTGGAGTCC CTGACAGGTT
   GAGGATTAGA TAGACACAGC ATATGACCTG AGACCTCAGG GACTGTCCAA
   . T G S G S G T D F T L K I S R V E .
201 CACTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTTCC GCTGAAAATC AGCAGAGTGG
   GTGACCGTCA OCTAGTCCCT GTCTAAAGTG CGACTTTTAG TCGTCTCAAC
   . A E D L G V Y Y C L Q A T H F P
251 AGGCTGAGGA TTTGGGAGTT TATTATTGTT TGCAAGCTAC ACATTTTCCT
   TCCGACTCCT AAACCTCAA ATAATAACAA ACGTTCGATG TGTAAAAGGA
   Q T F G G G T K L E I K R
301 CAGACGTTGG GTGGGGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAAACGG
   GTCTGCAAGC CACCGCCGTG GTTCGACCTT TAGTTTGCC

```

FIG. 2A

TFPI-4F36A1B2 VH (secuencia de nucleótidos y traducida, péptido de señal omitido):

```

      E V E L V E S G G G L V K P G G S .
1  GAGGTGGAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTAGTGAAGC CTGGAGGGTC
   CTCCACCTCG ACCACCTCAG ACCCCCTCCG AATCACTTCG GACCTCCCAG
   . L K L S C A A S G F T F S N Y A M .
51 CCTGAAACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACTTTCAGT AACTATGCCA
   GGACTTTGAG AGGACACGTC GGAGACCTAA GTGAAAGTCA TTGATACGGT
   . S W V R Q T P E K R L E W V A T
101 TGTCTTGGGT TCGCCAGACT CCGGAGAAGA GGCTGGAGTG GGTCCGAACC
   ACAGAAACCA AGCGGTCTGA GGCCTCTTCT CCGACCTCAC CCAGCGTTGG
   I S R S G S Y S Y F P D S V Q G R .
151 ATTAGTCGTA GTGGTAGTTA CTCCTACTTT CCAGACAGTG TGCAGGGTCG
   TAATCAGCAT CACCATCAAT GAGGATGAAA GGTCTGTCCAC ACGTCCCAGC
   . F T I S R D N A K N T L Y L Q M S .
201 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACCCTGTAC CTGCAAATGA
   TAAGTGGTAG AGGTCTCTGT TACGGTTCTT GTGGGACATG GACGTTTACT
   . S L R S E D T A M Y Y C T R L G
251 GCAGTCTGCG GTCTGAGGAC ACGGCCATGT ATTATTGTAC AAGACTTGGG
   CGTCAGACGC CAGACTCCTG TGCCGGTACA TAATAACATG TTCTGAACCC
   G Y D E G D A M D S W G Q G T S V .
301 GGTTACGACG AGGGGGATGC TATGGACTCC TGGGGTCAAG GAACCTCAGT
   CCAATGCTGC TCCCCTACG ATACCTGAGG ACCCCAGTTC CTTGGAGTCA
   . T V S S
351 CACCGTCTCC TCA
   GTGGCAGAGG AGT

```

FIG. 2B

ES 2 458 665 T3

1 2 3 4 5 6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 Kabat
DIVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLES DGKTYLNWLLQRPGESPKLLIYLVSIILDSGVDPD 4F36

7 8 9 10 11 12
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234 Kabat
RFTGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVIYCLQATHFP QTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ 4F36

13 14 15 16 17 18 19
567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 Kabat
LTSGGASVVCFLNNFYPRDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHN 4F36

20 21
123456789012345678901234 Kabat
SYTCEATHKTSTSPIVKSPNRNEC 4F36

FIG. 3A

1 2 3 4 5 6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890 Kabat
EVELVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMS WVRQTPEKRLEWVATISR SGSYSYFP 4F36

7 8 9 10 11
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 Kabat
DSVQGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCTRLGGYDEGD AMDSWGQGTSTTV 4F36

12 13 14 15 16 17
23456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456 Kabat
SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT 4F36

18 19 20 21
7890123456789012345678901234567890123456 Kabat
LSSSVTVPSSTWP8ETVTCNVHPASSTKVDDKIVPRDCG 4F36

FIG. 3B

ES 2 458 665 T3

1 DSEEDDEHTI	11 ITDTELPPLK	21 LMHSF CA FA	31 DDGPCKAIMK	41 RFFFNIFTRQ	51 CEEFIYGGCE
61 GNQ NR FES LE	71 ECK K MCT RDN	81 ANRIIK T TLQ	91 QEKPDF CF LE	101 EDP GICRGYI	111 TRY FYNNQTK
121 QCER FKYGGC	131 LGN MNNFETL	141 EECK NICEDG	151 PNGFQVDNYG	161 TQLNAVNN SL	171 TPQSTKVPSL
181 FEFHG PSW CL	191 TPAD RGLCRA	201 NENR FYYNSV	211 IGKCR PFKYS	221 GCGG NENNFT	231 SKQE CLRACK
241 KGFI Q RISK G	251 GLIK T KRKRK	261 KQ R VKIAYEE	271 IFVKNM		

Figura 4

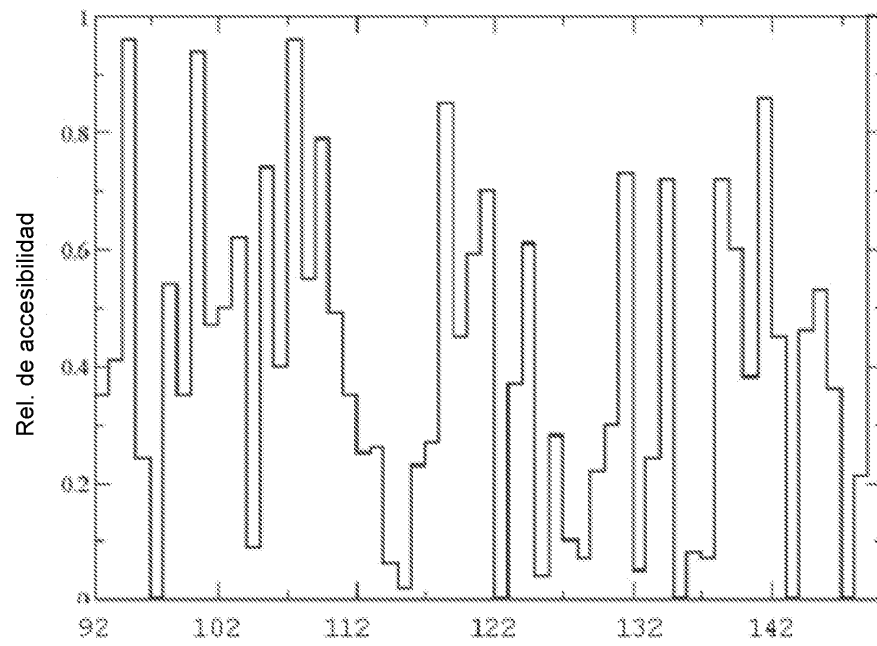


Figura 5

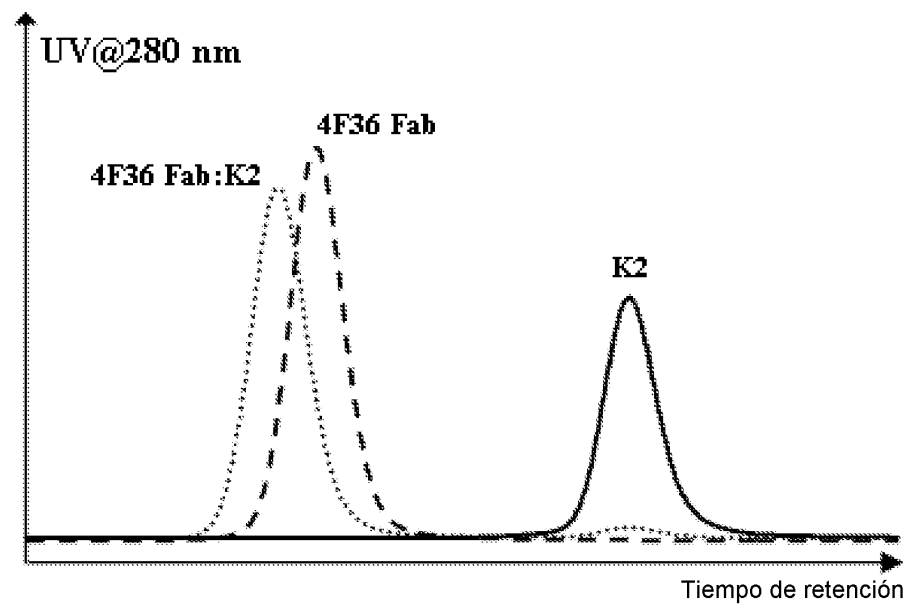


Figura 6

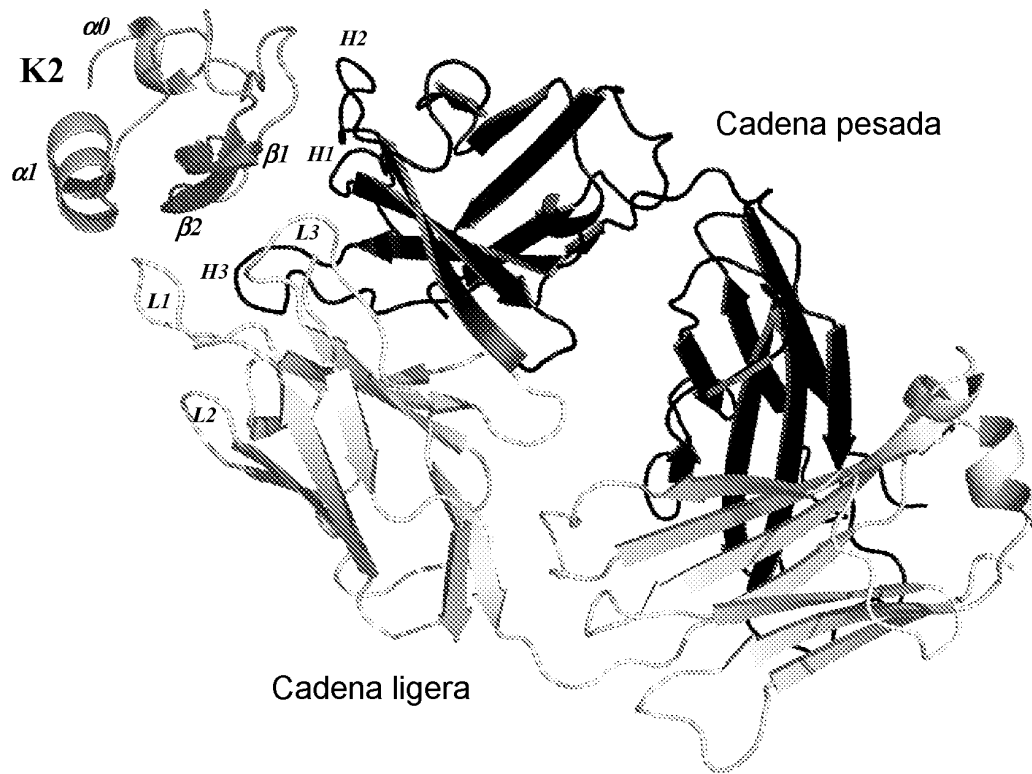


Figura 7

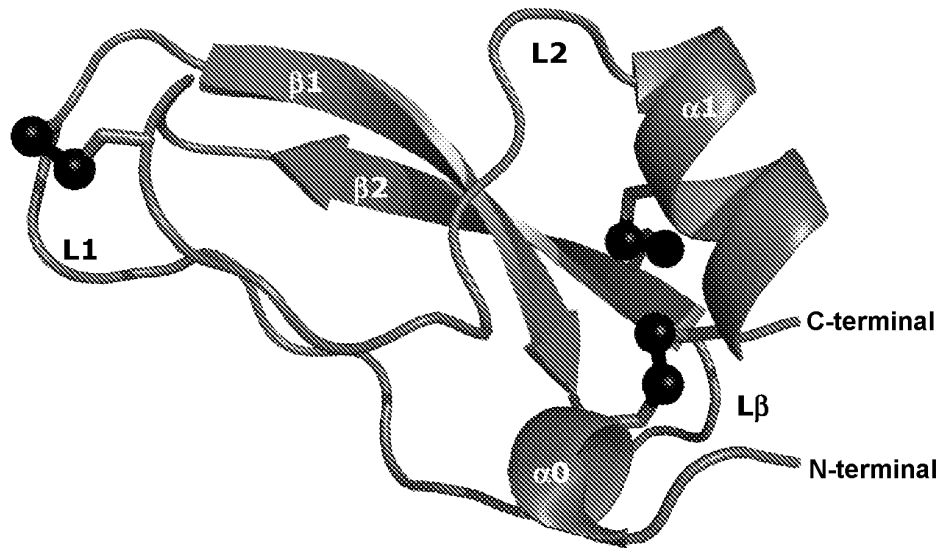


Figura 8

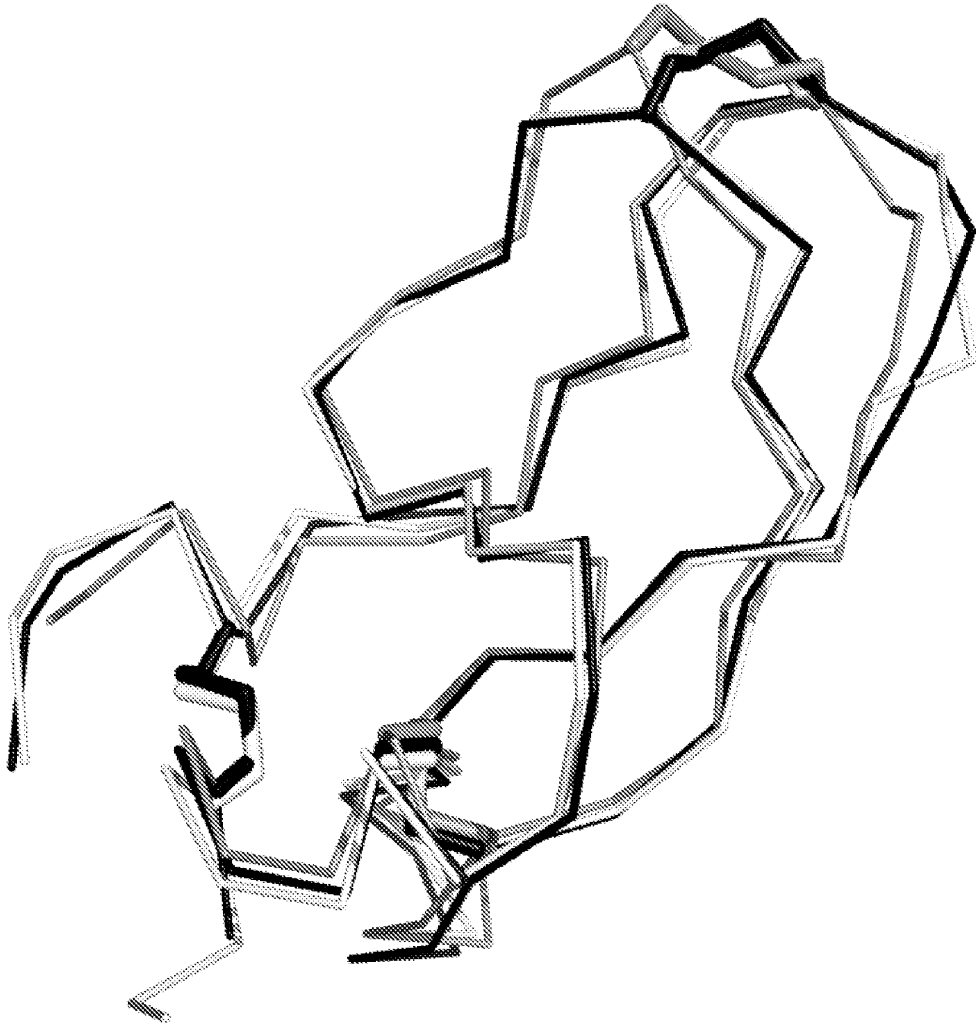


Figura 9

FIG. 10A

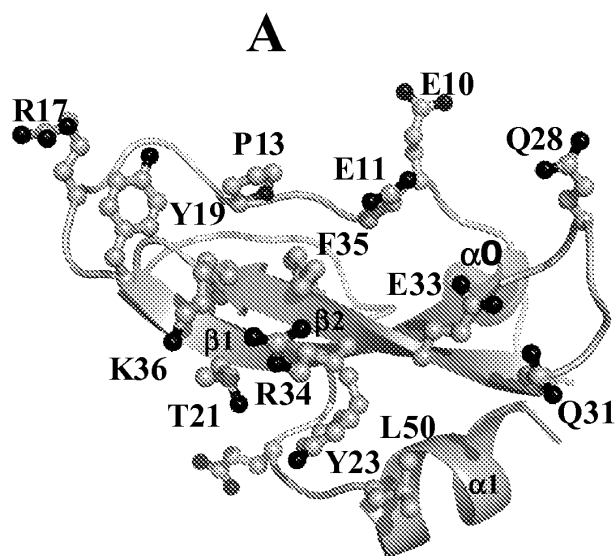
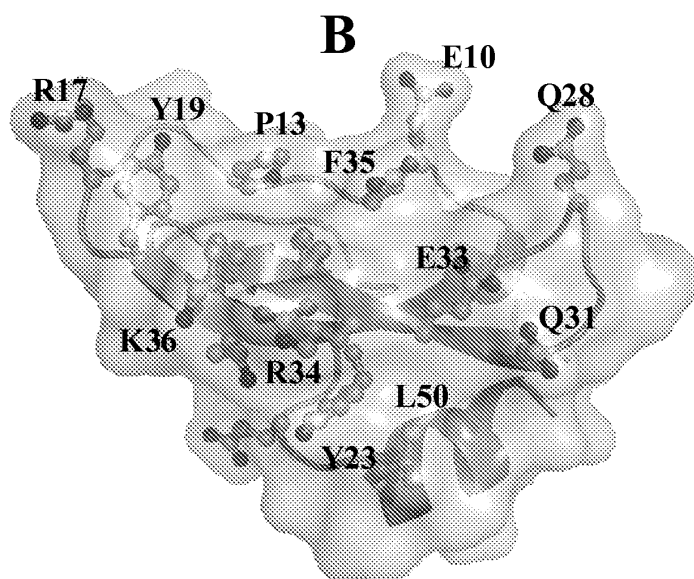


FIG. 10B



C

1 QEKPDFCFLE EDPGICRGYI TRYFYNNQTK
 hhhhh *s* *ssssss*
31 QCERFKYGGC LGNMNNFETL EECKNICEDG HHHHHH
 ssssss *h* *hhhhhh*

FIG. 10C

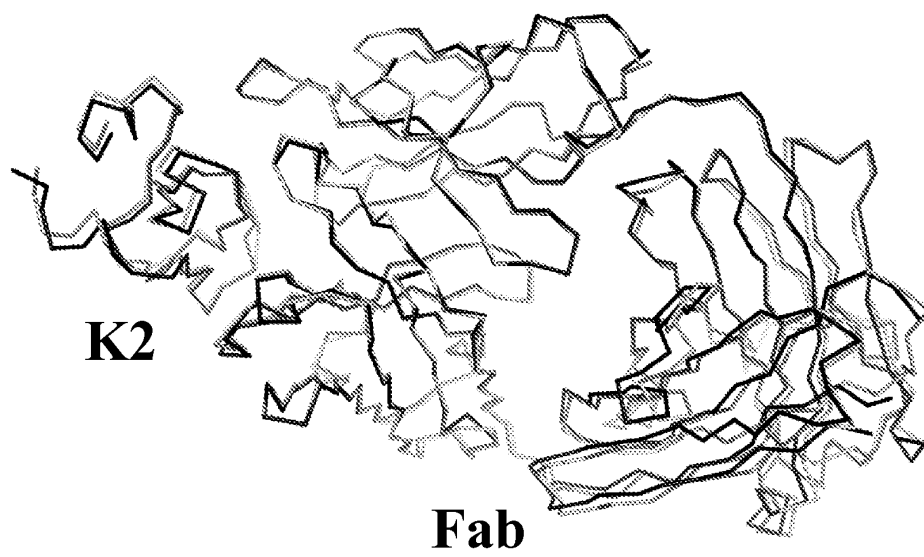


Figura 11

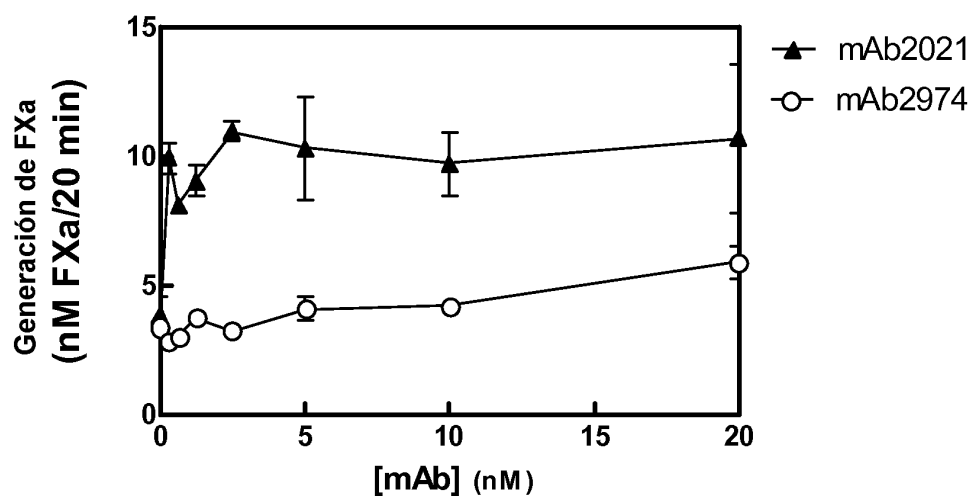


Figura 12

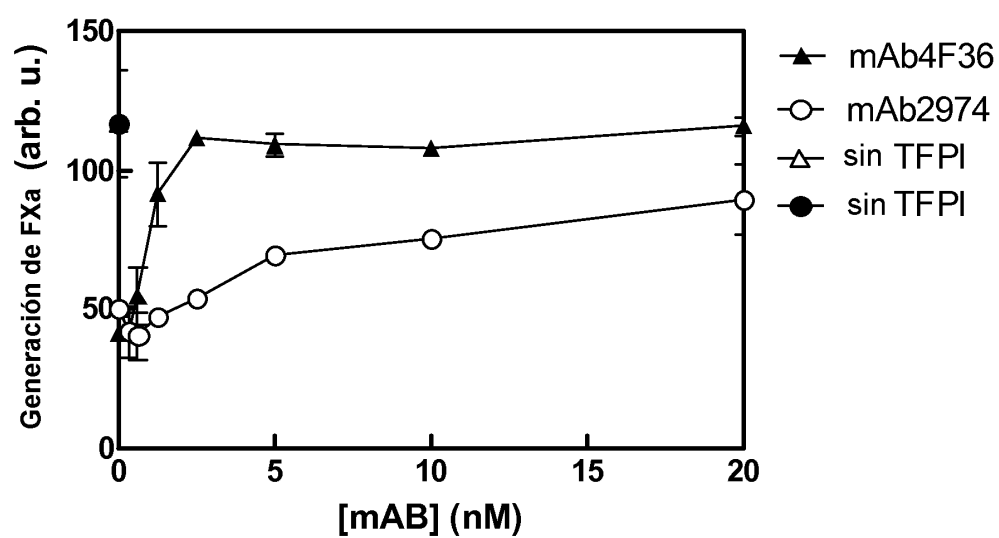


Figura 13

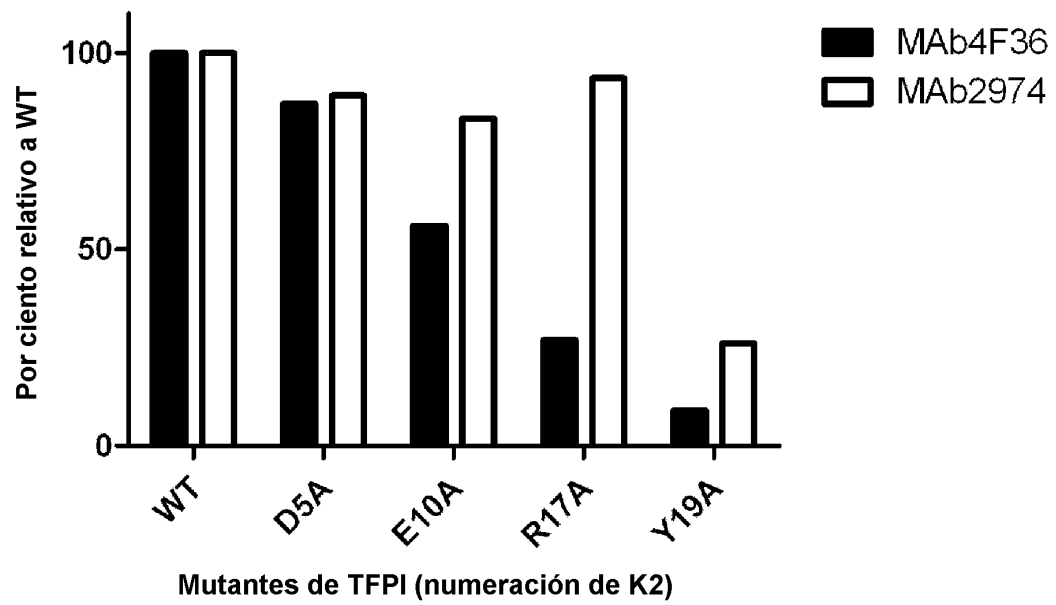


Figura 14

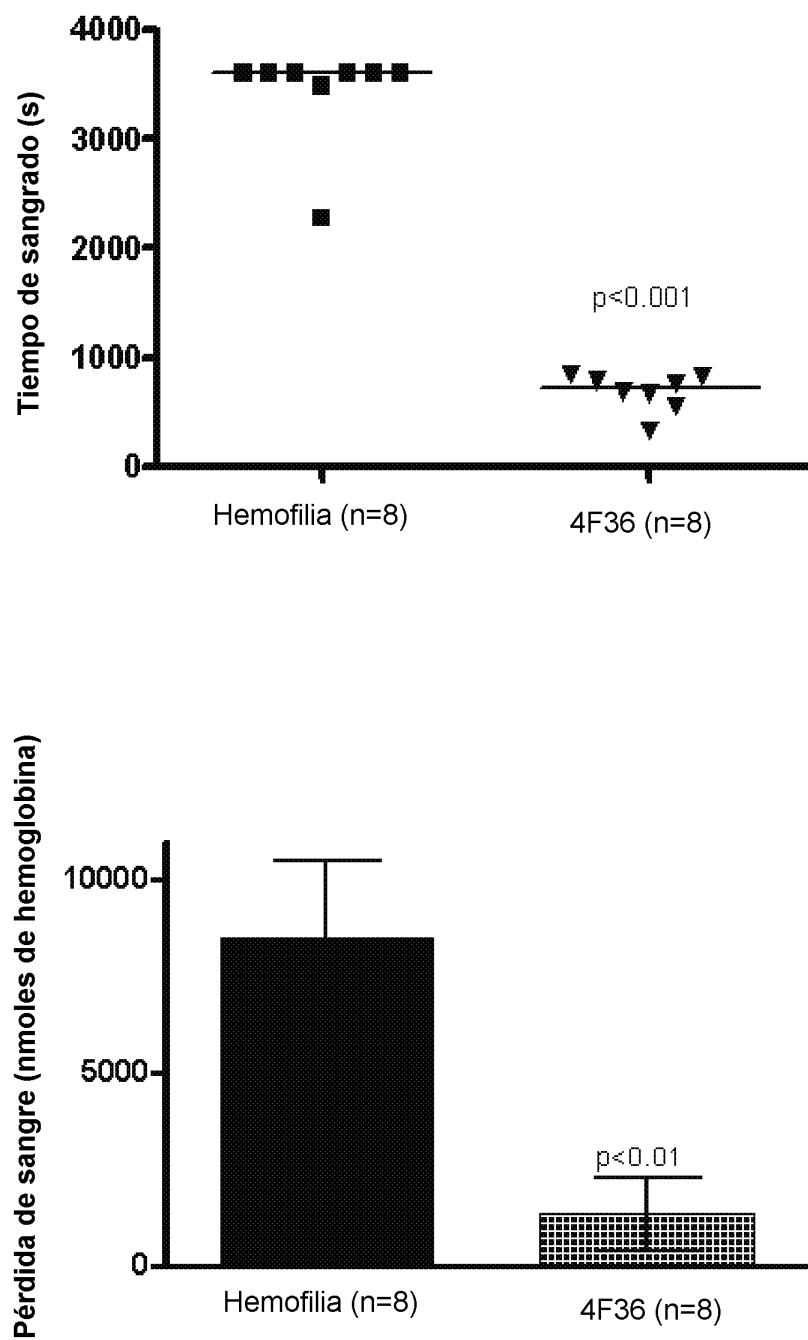


Figura 15

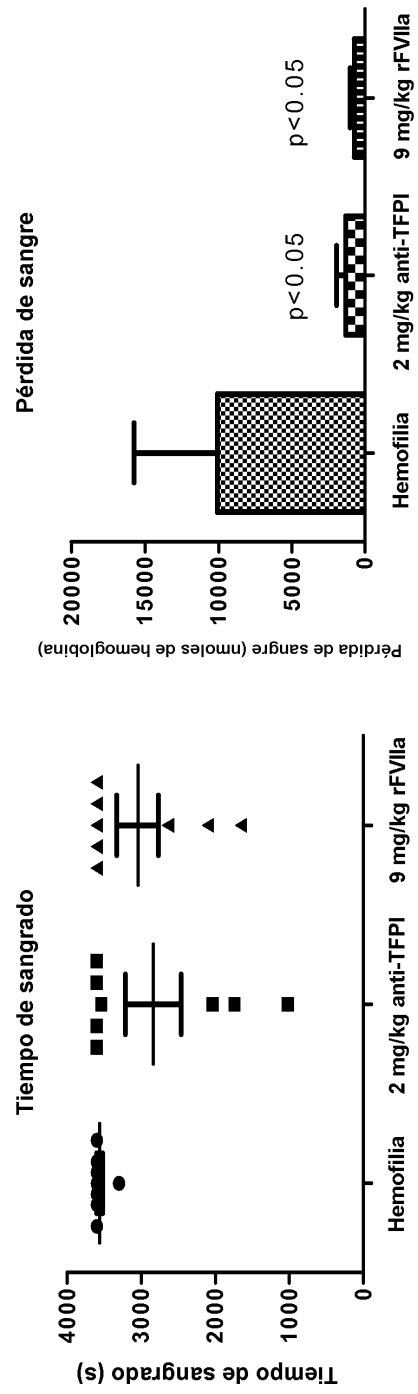


FIG. 16

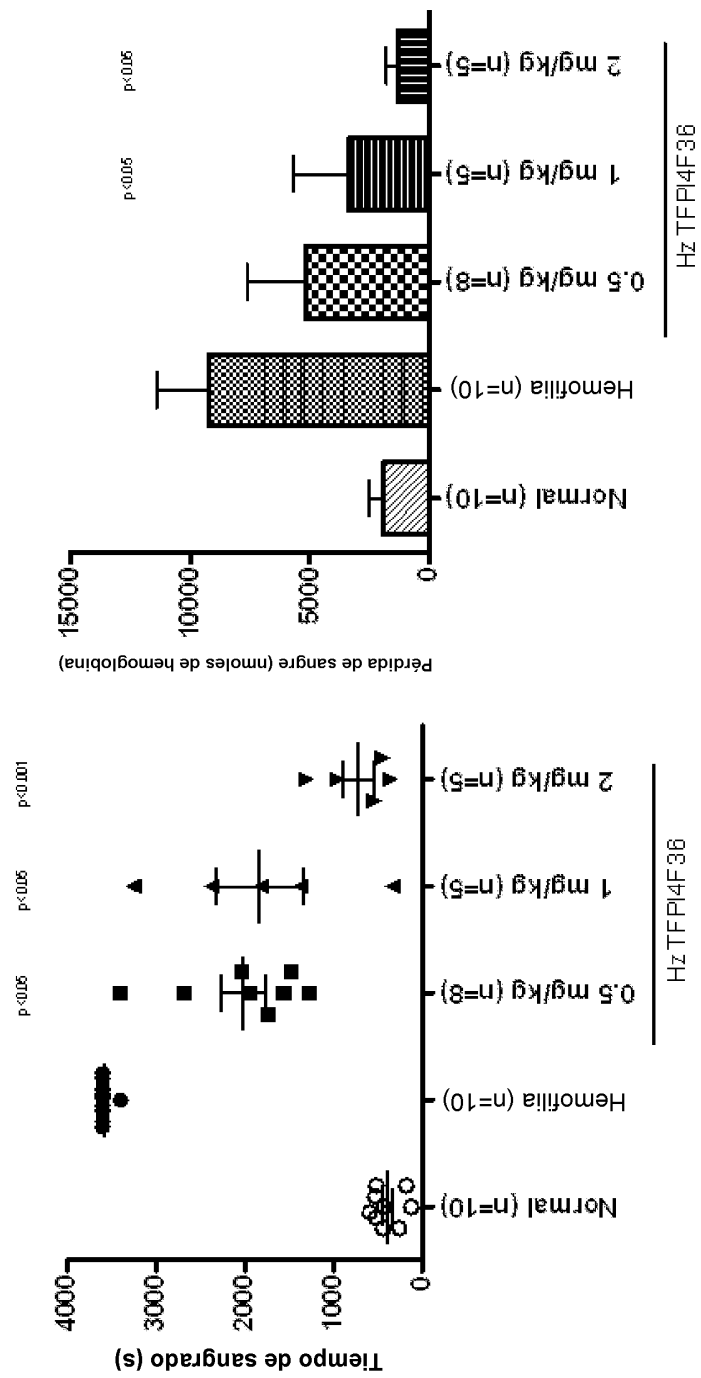


FIG. 17

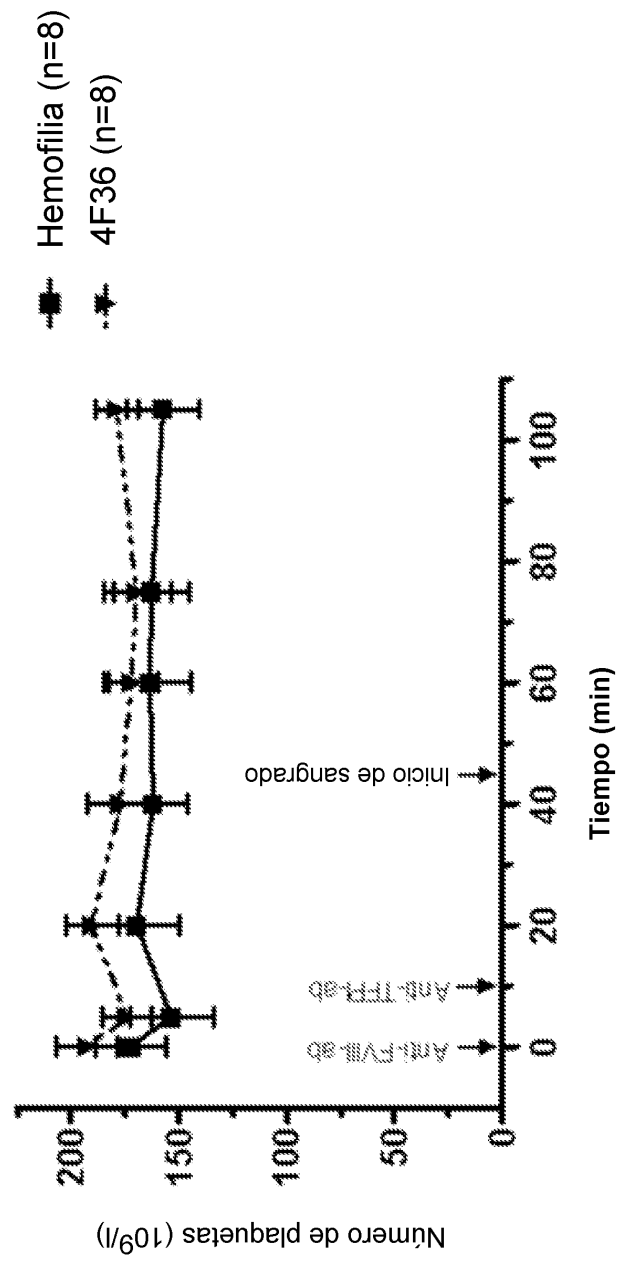


FIG. 18

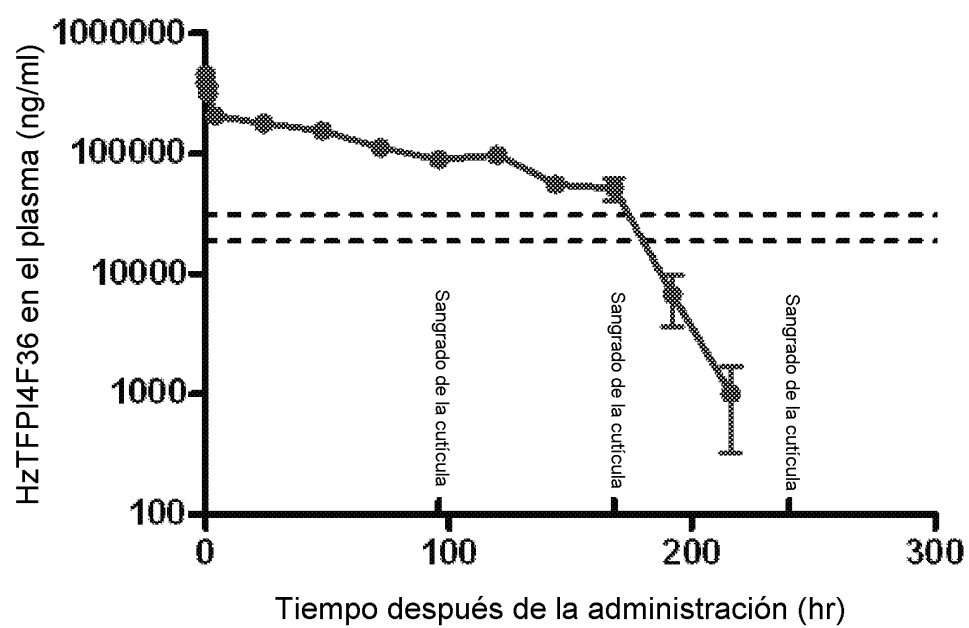


Figura 19

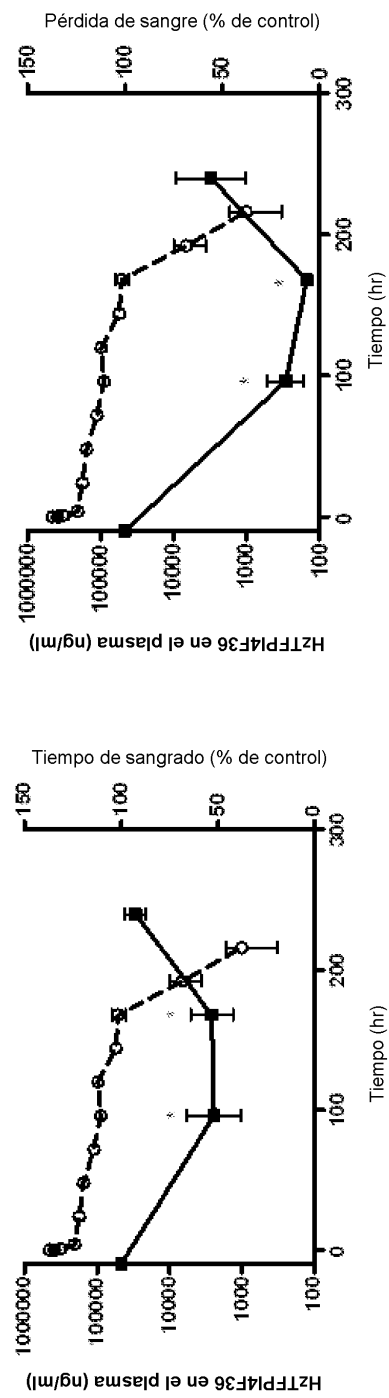


FIG. 20

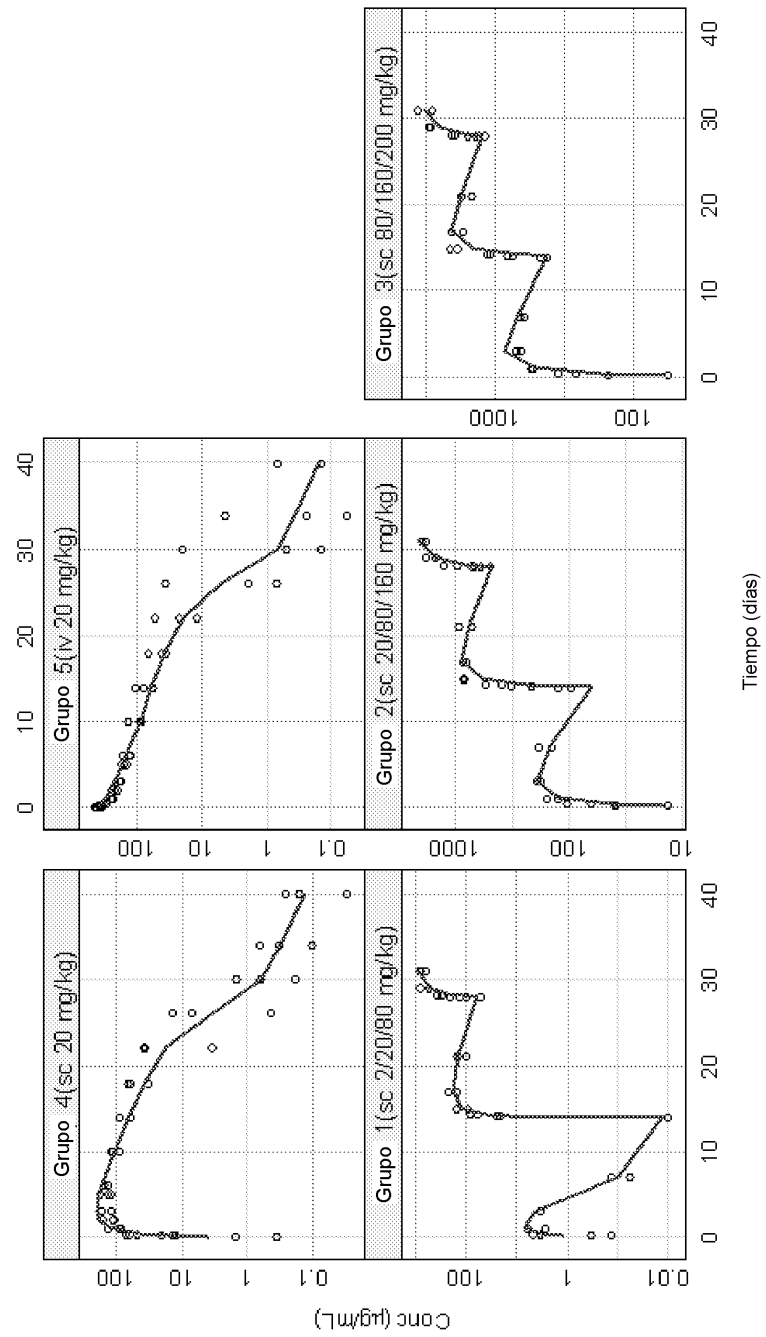


FIG. 21

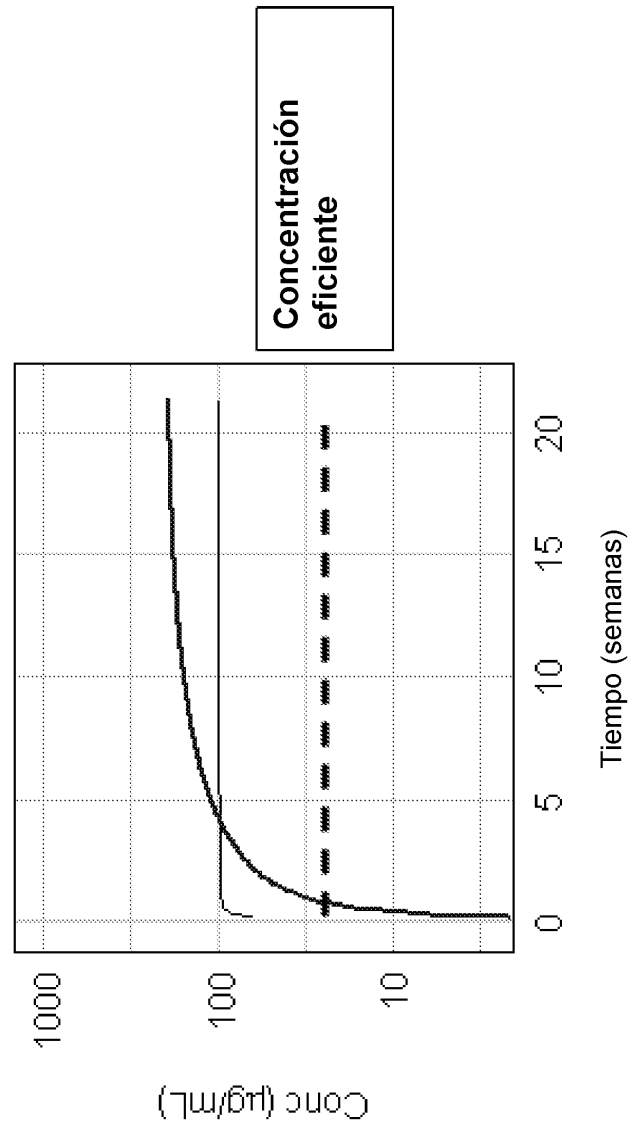


FIG. 22

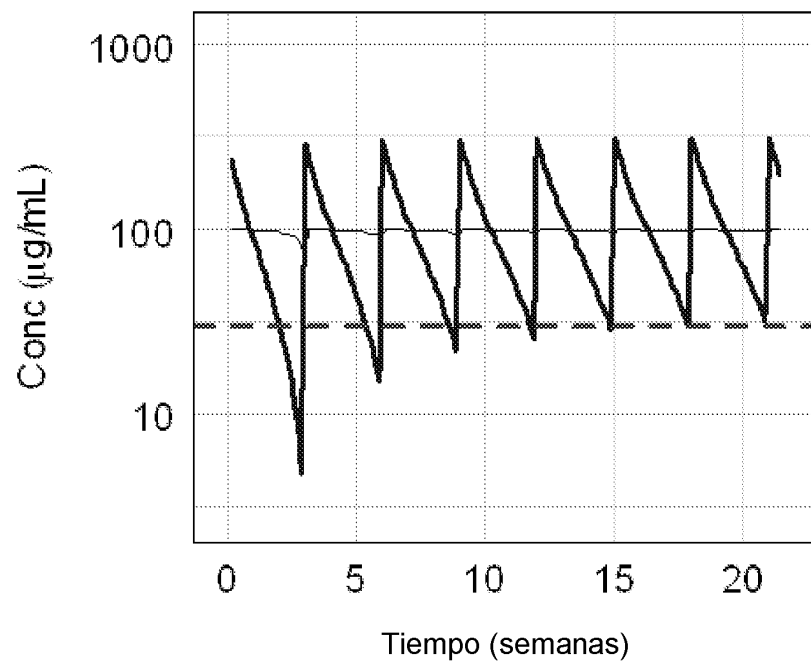


Figura 23

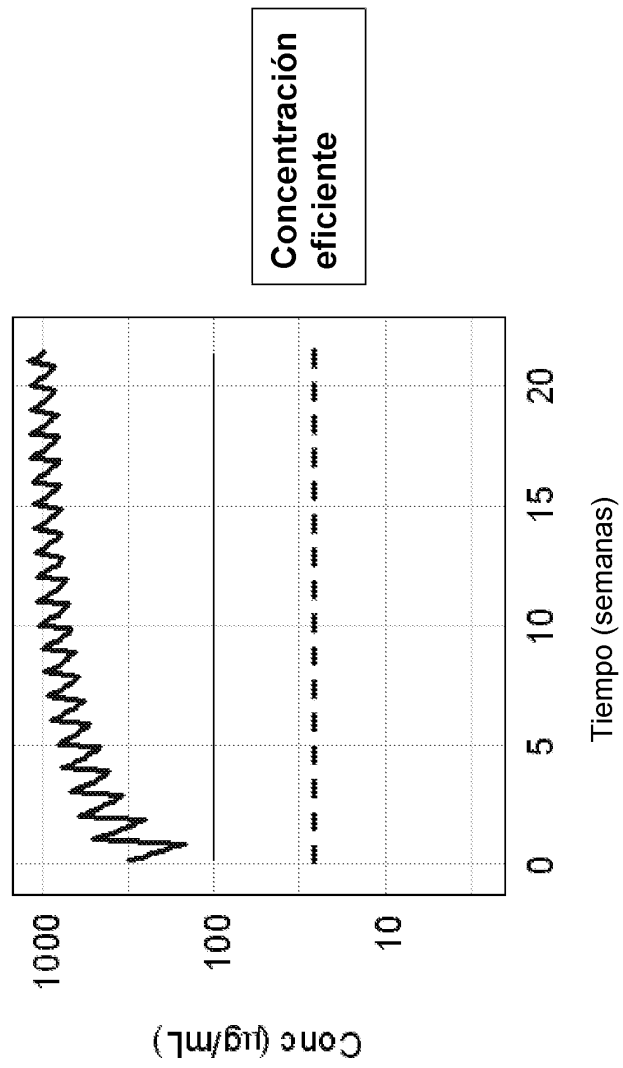


FIG. 24