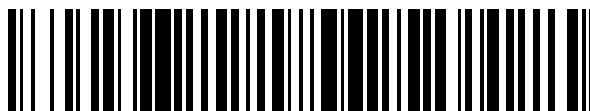


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 824**

51 Int. Cl.:

C07K 16/38

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/US2012/031538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135671**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12762959 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2694544**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI)**

30 Prioridad:

01.04.2011 US 201161471101 P

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

19.08.2019

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard
Whippany, NJ 07981-0915, US**

72 Inventor/es:

**WANG, ZHUOZHI;
MURPHY, JOHN;
MARQUARDT, TOBIAS y
MOOSMAYER, DIETER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 722 824 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI)

Campo de las realizaciones

- 5 Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados y fragmentos de los mismos que se unen al inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI, acrónimo del inglés *tissue factor pathway inhibitor*) humano.

Antecedentes

- 10 La coagulación sanguínea es un proceso mediante el cual la sangre forma coágulos estables para detener el sangrado. En el proceso intervienen una serie de proenzimas y procofactores (o "factores de coagulación") que están circulando en la sangre. Esas proenzimas y procofactores interactúan a través de varias rutas a través de las cuales se convierten, secuencial o simultáneamente, en la forma activada. En última instancia, el proceso produce la activación de

- 15 El proceso que conduce a la activación del Factor X puede llevarse a cabo mediante dos rutas distintas: la ruta de activación por contacto (anteriormente conocida como ruta intrínseca) y la ruta del factor tisular (anteriormente conocida como ruta extrínseca). Anteriormente se pensaba que la cascada de coagulación consistía en dos rutas igualmente importantes unidas a una ruta común. Ahora se sabe que la ruta principal para el inicio de la coagulación sanguínea es la ruta del factor tisular.

- 20 El factor tisular (TF), en combinación con el factor VII activado (FVIIa), puede activar al factor X. El complejo de FVIIa y su cofactor esencial, TF, es un fuerte iniciador de la cascada de coagulación.

- 25 La ruta de la coagulación del factor tisular está controlada negativamente por el inhibidor de la ruta del factor tisular ("TFPI"). El TFPI es un inhibidor natural de la retroalimentación dependiente de FXa del complejo FVIIa/TF. Es un miembro de inhibidores multivalentes de la serina proteasa de tipo Kunitz. Fisiológicamente, el TFPI se une al Factor X activado (FXa), para formar un complejo heterodimérico, que posteriormente interactúa con el complejo FVIIa/TF para inhibir su actividad, lo que detiene la ruta del factor tisular de coagulación. En principio, el bloqueo de la actividad del TFPI puede restaurar la actividad de FXa y FVIIa/TF, prolongando así la duración de la acción de la ruta del factor tisular y amplificando la generación de FXa, que es el defecto común en la hemofilia A y B.

- 30 De hecho, algunas pruebas experimentales preliminares han indicado que el bloqueo de la actividad de TFPI con anticuerpos contra el TFPI, normaliza el tiempo de coagulación prolongado o reduce el tiempo de sangrado. Por ejemplo, Nordfang y col. mostraron que el tiempo de protrombina diluida prolongado de plasma con hemofilia, se normalizaba después de tratar el plasma con anticuerpos contra TFPI (Thromb. Haemost., 1991, 66(4): 464-467). De manera similar, Erhardtson y col. mostraron que el tiempo de sangrado en el modelo de hemofilia A en conejos, se reducía significativamente con anticuerpos anti TFPI (Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1995, 6: 388-394). Estos estudios sugieren que la inhibición de TFPI con los anticuerpos anti TFPI puede ser útil para el tratamiento de la

- 35 hemofilia A o B. En estos estudios solo se utilizó el anticuerpo policlonal anti TFPI.
- 40 Utilizando técnicas de hibridoma, se prepararon e identificaron anticuerpos monoclonales contra el TFPI humano recombinante (rhTFPI) (véase Yang y col., Chin. Med. J., 1998, 111(8): 718-721). Se analizó el efecto del anticuerpo monoclonal sobre el tiempo de protrombina (TP) diluida y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa). Los experimentos mostraron que el anticuerpo monoclonal anti TFPI reducía el tiempo de coagulación de tromboplastina diluida de plasma deficiente en factor IX. Se sugiere que la ruta del factor tisular desempeña un papel importante no solo en la coagulación fisiológica sino también en la hemorragia de la hemofilia (Yang y col., Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1997, 22(4): 297-300).

Los documentos WO 2010/017196 y WO 2010/0072691 también desvelan anticuerpos monoclonales que se unen al inhibidor de la ruta del factor tisular humano.

- 45 Por consiguiente, para el tratamiento de enfermedades hematológicas y del cáncer, se necesitan anticuerpos específicos para TFPI.

- 50 En general, utilizando ingeniería genética para crear anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o totalmente humanos, se han generado anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas. Se demostró que los anticuerpos monoclonales murinos tenían un uso limitado como agentes terapéuticos debido a su corta semivida en suero, a una incapacidad para desencadenar funciones efectoras humanas y a la producción de anticuerpos humanos anti ratón (Brekke y Sandlie, "Therapeutic Antibodies for Human Diseases at the Dawn of the Twenty-first Century," *Nature* 2, 53, 52-62, enero de 2003). Se ha demostrado que los anticuerpos quiméricos dan lugar a respuestas de anticuerpos anti quiméricos humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados minimizan el componente de ratón de los anticuerpos. Sin embargo, un anticuerpo totalmente humano impide la inmunogenicidad asociada a elementos completamente murinos. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos totalmente

humanos para impedir la inmunogenicidad asociada a otras formas de anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética. En particular, para el tratamiento profiláctico crónico, tal como el tratamiento de la hemofilia, serían necesarios anticuerpos humanizados o, preferentemente, totalmente humanos. Un anticuerpo monoclonal anti TFPI tiene un alto riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria a la terapia si se utiliza un anticuerpo con un componente murino o de origen murino debido a la gran cantidad de dosis requerida y a la larga duración de la terapia. Por ejemplo, la terapia con anticuerpos para la hemofilia A puede requerir una dosificación semanal durante toda la vida del paciente. Esto sería un desafío continuo para el sistema inmunitario. Por tanto, existe la necesidad de un anticuerpo totalmente humano para la terapia con anticuerpos para tratar la hemofilia y las deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación.

Se han fabricado anticuerpos terapéuticos mediante la tecnología del hibridoma, descrita por Koehler y Milstein en "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity," *Nature* 256, 495-497 (1975). También pueden producirse anticuerpos totalmente humanos de manera recombinante en procariotas y eucariotas. Para un anticuerpo terapéutico, se prefiere la producción recombinante de un anticuerpo en una célula hospedadora en lugar de la producción de hibridoma. La producción recombinante tiene las ventajas de una mayor consistencia del producto, probablemente un mayor nivel de producción y una fabricación controlada que minimice o elimine la presencia de proteínas derivadas de animales. Por estas razones, es deseable tener un anticuerpo monoclonal anti TFPI producido de manera recombinante.

Además, dado que el TFPI se une al Factor X activado (FXa) con alta afinidad, un anticuerpo anti TFPI eficaz debería tener una afinidad comparable. Por tanto, es deseable tener un anticuerpo anti TFPI que tenga una afinidad de unión que pueda competir con la unión de TFPI/FXa.

Sumario

Se proporcionan anticuerpos monoclonales que tienen unión específica con un epítipo específico del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (TFPI). También se proporcionan polinucleótidos que codifican los anticuerpos monoclonales anti TFPI. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti TFPI y procedimientos de tratamiento de deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación, tales como la hemofilia A y B.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la formación de complejos de Fab B y de los dominios 1 + 2 de Kunitz del TFPI por análisis de exclusión de tamaño.

La Figura 2 ilustra dos representaciones animadas que muestran la interacción entre el inhibidor de la ruta del factor tisular humano y un anticuerpo del mismo (Fab B) en un primer ángulo y en otro ángulo girado 90 grados con respecto al primer ángulo. En la parte inferior de la figura (sombreado en gris) se muestra el Fab B con los dominios de la región variable ligera (V_L) y pesada (V_H). El dominio 1 de Kunitz (KD1) del TFPI se muestra en blanco y el dominio 2 de Kunitz (KD2) del TFPI se muestra en negro.

La figura 3 ilustra restos de epítipos clave Asp31 (D31), Asp32 (D32), Pro34 (P34), Lys36 (K36), Glu60 (E60), el puente disulfuro Cys35-Cys59, y la unión del dominio 1 de Kunitz del TFPI en la superficie de Fab B. También se muestra, pero sin detalle, la unión del dominio 2 de Kunitz.

La Figura 4 ilustra dos ángulos de vista de la unión e interacción de los restos de epítipo Glu100 (E100), Glu101 (E101), Pro103 (P103), Ile105 (I105), Arg107 (R107), Tyr109 (Y109) del dominio 2 de Kunitz con Fab B. Arg107 interacciona con Gly33 (G33) y Cys35 (C35) del dominio 1 de Kunitz.

La Figura 5 ilustra una superposición del complejo TFPI - Fab B y un complejo de BPTI, factor VIIa y factor tisular, y muestra la exclusión de la unión simultánea de TFPI con el factor VIIa/factor tisular y Fab B. El impedimento estérico de Fab B y factor VIIa, y de Fab B y factor tisular se indica con flechas.

La Figura 6 ilustra una superposición del complejo TFPI - Fab B y un dominio 2 de Kunitz unido a tripsina y muestra la exclusión de la unión simultánea de TFPI con el factor Xa y Fab B. Se indica el impedimento estérico de Fab B y tripsina, y de Fab B unido al dominio 1 de Kunitz y tripsina.

La Figura 7 ilustra (A) una alineación de secuencia de las cadenas ligera y pesada de Fab B (SEQ ID NO: 4 y 5) y Fab D (SEQ ID NO: 8 y 9) y (B) una superposición de estructura TFPI - Fab B por rayos X con modelos de homología de Fab D. (A) los restos paratópicos están en negrita y resaltados. Los restos paratópicos que difieren en Fab B y Fab D están marcados con un asterisco. (B) el dominio 1 de Kunitz (KD1) el dominio 2 de Kunitz (KD2) se muestran como dibujos en color gris claro y negro, respectivamente. Las estructuras Fab se muestran como una cinta de color gris. Los restos paratópicos que difieren en Fab B y Fab D se muestran como barras.

Descripción detallada**Definiciones**

La expresión "inhibidor de la ruta del factor tisular" o "TFPI", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier variante, isoforma y especie homóloga del TFPI humano que se expresa en las células de manera natural.

- 5 En una realización preferida de la invención, la unión de un anticuerpo de la invención con el TFPI reduce el tiempo de coagulación de la sangre.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo completo y a cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o a una sola cadena de los mismos. El término incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo de IgG) que se produce de manera natural o se forma por procedimientos recombinantes de fragmentos del gen de inmunoglobulina normal, o de una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento de anticuerpo, que conserva la actividad de unión específica. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti TFPI se une a un epítipo de TFPI. La función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Como ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; (vii) minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y cuerpos kappa (véase, por ejemplo, Ill y col., Protein Eng 1997;10:949-57); (viii) IgG de camello; y (ix) IgNAR. Asimismo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes distintos, estos pueden unirse, utilizando procedimientos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite constituirse como una cadena de proteína única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv)); véase, por ejemplo, Bird y col., (1988) Science 242:423-426; Y Huston y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden incluirse dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Asimismo, se contempla que un fragmento de unión a antígeno pueda estar incluido en un mimético de anticuerpo. La expresión "mimético de anticuerpo" o "mimético", como se usa en el presente documento, significa una proteína que presenta una unión similar a la de un anticuerpo, pero que es un anticuerpo alternativo más pequeño o una proteína no anticuerpo. Dicho anticuerpo mimético puede estar comprendido en un armazón. El término "armazón" se refiere a una plataforma de polipéptidos para la ingeniería de nuevos productos con funciones y características personalizadas.

El término "epítipo" se refiere al área o a la región de un antígeno con el que se une o con el que interacciona específicamente un anticuerpo, que en algunas realizaciones indica dónde el antígeno está en contacto físico con el anticuerpo. Por el contrario, el término "parátipo" se refiere al área o región del anticuerpo sobre el que se une específicamente el antígeno. Se dice que los epítipos caracterizados por la unión competitiva se superponen si la unión de los anticuerpos correspondientes se excluye mutuamente, es decir, la unión de un anticuerpo excluye la unión simultánea de otro anticuerpo. Se dice que los epítipos están separados (son únicos) si el antígeno es capaz de acomodar simultáneamente la unión de ambos anticuerpos correspondientes.

La expresión "anticuerpos competitivos", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que se unen a aproximadamente, sustancial o esencialmente al mismo, o incluso al mismo, epítipo como un anticuerpo contra TFPI como se describe en este documento. Los "anticuerpos competitivos" incluyen anticuerpos con especificidades de epítipos solapantes. Por tanto, los anticuerpos competitivos pueden competir eficazmente con un anticuerpo como se describe en el presente documento para unirse al TFPI. Preferentemente, el anticuerpo competitivo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo descrito en el presente documento. Visto de manera alternativa, el anticuerpo competitivo tiene la misma especificidad de epítipo que el anticuerpo descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "inhibe la unión" y "bloquea la unión" (por ejemplo, refiriéndose a la inhibición/bloqueo de la unión del ligando de TFPI con TFPI) se utilizan indistintamente e incluyen tanto la inhibición como el bloqueo parcial y completo. La inhibición y el bloqueo también pretenden incluir cualquier disminución medible en la afinidad de unión de TFPI con un sustrato fisiológico cuando se pone en contacto con un anticuerpo anti TFPI en comparación con TFPI que no se pone en contacto con un anticuerpo anti TFPI, por ejemplo, el bloqueo de la interacción de TFPI con el factor Xa o el bloqueo de la interacción de un complejo de TFPI-factor Xa con el factor tisular, factor VIIa o el complejo de factor tisular/factor VIIa en al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una

composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Por consiguiente, La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

Un "anticuerpo aislado," como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une a TFPI carece sustancialmente de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de TFPI). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une a un epítipo, isoforma o variante de TFPI humano puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otra especie (por ejemplo, homólogos de especie se TFPI). Además, un anticuerpo aislado puede carecer sustancialmente de otros materiales celulares y/o químicos.

Como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo con un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente 10^5 M^{-1} y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es mayor, por ejemplo, al menos dos veces mayor, que su afinidad para unirse a un antígeno irrelevante (por ejemplo, BSA, caseína) distinta de la del antígeno predeterminado o de la de un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce a un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno", se utilizan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se usa en el presente documento, la expresión "alta afinidad" por un anticuerpo de IgG, se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , en algunas realizaciones de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} , en algunas realizaciones de al menos aproximadamente 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o mayor, por ejemplo, hasta 10^{13} M^{-1} o mayor. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" por un isotipo de IgM se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de la región constante de la cadena pesada.

"Región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a una de las tres regiones hipervariables dentro de la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera de una molécula de anticuerpo que forma la superficie de unión al antígeno N-terminal que es complementaria a la estructura tridimensional del antígeno unido. Procediendo desde el extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones determinantes de la complementariedad se indican como "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Las CDR intervienen en la unión entre el antígeno y el anticuerpo, y la CDR3 comprende una región única específica para la unión entre el antígeno y el anticuerpo. Por lo tanto, un sitio de unión al antígeno, puede incluir seis CDR, que comprende las regiones CDR de cada una de una región V de cadena pesada y ligera.

Como se usa en el presente documento, "sustituciones conservativas" se refiere a las modificaciones de un polipéptido que implican la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares que no producen la pérdida de una función biológica o bioquímica del polipéptido. Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es aquella en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Se contempla que los anticuerpos de la presente invención puedan tener sustituciones de aminoácidos conservativas y conservar aún la actividad.

Para los ácidos nucleicos y los polipéptidos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan de manera óptima, son idénticos, con inserciones o deleciones apropiadas de nucleótidos o aminoácidos, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos o aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente 85 %, preferentemente aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, o 95 %, más preferentemente al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 % o 99,5 % de los nucleótidos o aminoácidos. Como alternativa, existe una homología sustancial para los ácidos nucleicos cuando los segmentos se hibridarán en condiciones de hibridación selectiva con el complemento de la cadena. La invención incluye secuencias de ácido nucleico y secuencias polipeptídicas que tienen una homología sustancial con las secuencias de ácido nucleico específicas y secuencias de aminoácidos citadas en el presente documento.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n° de posiciones idénticas / n° total de posiciones $\times 100$), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para obtener una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos

secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, tal como, sin limitación, el módulo AlignX™ de VectorNTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Para AlignX™, los parámetros por defecto de alineación múltiple son: penalización por apertura de huecos: 10; penalización por extensión de huecos: 0,05; intervalo de penalización por separación de huecos: 8; % de identidad para el retraso de alineación: 40. (Puede encontrar más detalles en [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/IIIS\[NEA-Online-Guides/IIIS\[NEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/IIIS[NEA-Online-Guides/IIIS[NEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html)).

Otro procedimiento para determinar la mejor coincidencia total entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia de sujeto, también denominada alineación de secuencia global, puede determinarse utilizando el programa informático CLUSTALW (Thompson y col., Nucleic Acids Research, 1994, 2(22): 4673-4680), que se basa en el algoritmo de Higgins y col., (Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), 1992, 8(2): 189-191). En una alineación de secuencia, tanto la secuencia de consulta como la secuencia de sujeto son secuencias de ADN. El resultado de dicha alineación de secuencia global es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos, utilizados en una alineación de secuencias de ADN de tipo CLUSTALW, para calcular el porcentaje de identidad a través de alineaciones por pares son: Matriz = IUB, k-tupla = 1, Número de diagonales superiores = 5, Penalización por hueco = 3, Penalización por apertura de hueco = 10, Penalización por extensión hueco = 0,1. Para alineaciones múltiples, se prefieren los siguientes parámetros de CLUSTALW: Penalización por apertura de hueco = 10, Parámetro de extensión de hueco = 0,05; Intervalo de penalización por separación de hueco = 8; % de identidad para el retraso de alineación = 40.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares con los que normalmente está asociado en el ambiente natural. Para aislar un ácido nucleico, pueden utilizarse técnicas convencionales tales como las siguientes: tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis de gel de agarosa y otras técnicas bien conocidas en la materia.

Anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos específicos de TFPI

En el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales con unión específica al TFPI humano como se muestra en la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti TFPI inhiben la unión de un ligando de TFPI con TFPI. Por tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti TFPI pueden inhibir la actividad de TFPI.

Se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEQ ID NO: 1), en el que dicho epítipo comprende uno o más restos del dominio 2 de Kunitz. El anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con la invención comprende la cadena ligera como se muestra en la SEC ID NO: 4 y la cadena pesada como se muestra en la SEC ID NO: 5. En algunos aspectos de la divulgación, también se contempla que el anticuerpo monoclonal aislado pueda comprender una cadena ligera o pesada con una homología sustancial con las proporcionadas. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal aislado que comprende una homología sustancial puede comprender una o más sustituciones conservativas.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEQ ID NO: 1), en el que dicho epítipo comprende uno o más restos seleccionados de Glu100, Glu101, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, de SEQ ID NO:1 y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Glu100 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Glu101 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly104 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Ile105 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Cys106 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Arg107 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly108 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Tyr109 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Lys126 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly128 de SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, el epítipo comprende adicionalmente uno o más restos seleccionados de Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Ile105 de SEQ ID NO:1. Y en algunas realizaciones, el epítipo comprende adicionalmente uno o más restos seleccionados de Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de SEQ ID NO: 1.

También se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEQ ID NO: 1), en el que dicho epítipo comprende uno o más restos del dominio 1 de Kunitz y uno o más restos del dominio 2 de Kunitz.

En algunas realizaciones, los restos de dominio 1 de Kunitz comprenden uno o más restos seleccionados de Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62 de SEQ ID NO:1 y sus combinaciones. En algunas

- realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Asp31 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Asp32 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Gly33 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Pro34 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Cys35 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Lys36 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Cys59 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Glu60 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende el resto Asn62 de SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones, los restos del dominio 1 de Kunitz comprenden los restos Pro34 y Glu60 de SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones, los restos del dominio 1 de Kunitz comprenden los restos Pro34 y Lys36 de SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones, los restos del dominio 1 de Kunitz comprenden los restos Pro34, Lys36 y Glu60 de SEQ ID NO:1.
- En algunas realizaciones, los restos del dominio 2 de Kunitz comprenden uno o más restos seleccionados de Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr409, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128 de SEQ ID NO:1 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Glu100 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Glu101 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Pro103 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Gly104 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Ile105 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Cys106 de SEQ ID NO:1.
- En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Arg107 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Gly108 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Tyr109 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Phe114 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Asn116 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Glu123 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Arg124 de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Lys126 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Tyr127 de SEQ ID NO:1.
- En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende los restos Arg107 y Glu101 de SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende los restos Arg107 y Tyr109 de SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende los restos Arg107, Glu101 y Tyr109 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende el resto Gly128 de SEQ ID NO:1.
- En algunas realizaciones, el resto del dominio 2 de Kunitz puede comprender adicionalmente uno o más restos seleccionados de Asp102, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de SEQ ID NO:1 y sus combinaciones.
- En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo monoclonal aislado comprende un resto del dominio 1 de Kunitz que comprende uno o más restos seleccionados de Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62; y un resto del dominio 2 de Kunitz que comprende uno o más restos seleccionados de Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128.
- También se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEQ ID NO: 1), en el que dicho epítipo comprende dos bucles de aminoácidos ligados mediante un puente disulfuro entre los restos Cys35 y Cys59 de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el epítipo comprende adicionalmente uno o más restos del dominio 1 de Kunitz y uno o más restos del dominio 2 de Kunitz. En algunas realizaciones, el resto del dominio 1 de Kunitz comprende uno o más restos seleccionados de Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62 de SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, el resto del dominio 2 de Kunitz comprende uno o más restos seleccionados de Glu100, Glu104, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128 de SEQ ID NO:1.
- También se proporcionan anticuerpos que pueden competir con cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento para unirse al TFPI. Por ejemplo, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que los anticuerpos descritos en el presente documento, podrá competir eficazmente por la unión de TFPI. En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a TFPI, en el que el anticuerpo monoclonal aislado es competitivo con cualquiera de los anticuerpos monoclonales aislados descritos en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se muestra en la SEC ID NO: 4. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena pesada como se muestra en la SEC ID NO: 5. En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se muestra en la SEC ID NO: 4 y una cadena pesada como se muestra en la SEC ID NO: 5.
- También se proporcionan anticuerpos biespecíficos que pueden competir con cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento para unirse al TFPI. Por ejemplo, dicho anticuerpo biespecífico puede unirse a uno o más

epítomos descritos anteriormente.

El anticuerpo puede ser específico de una especie o puede reaccionar de forma cruzada con múltiples especies. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede reaccionar específicamente o reaccionar de forma cruzada con el TFPI de ser humano, ratón, rata, cobaya, conejo, mono, cerdo, perro, gato o de otra especie de mamífero.

- 5 El anticuerpo puede ser de cualquiera de las diversas clases de anticuerpos, tales como, sin limitación, un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, una IgA secretora, un anticuerpo de IgD y de IgE.

Ácidos nucleicos, Vectores y Células hospedadoras

- 10 Aunque se proporcionan secuencias de aminoácidos de los anticuerpos monoclonales, se contempla que puedan diseñarse secuencias de ácido nucleico que codifiquen cualquiera de estos anticuerpos monoclonales. Dichos polinucleótidos pueden codificar una cadena ligera o una cadena pesada del anticuerpo anti TFPI. En algunas realizaciones, dichos polinucleótidos pueden codificar tanto la cadena ligera como la cadena pesada del anticuerpo anti TFPI separadas por un enlace degradable. Adicionalmente, los anticuerpos mencionados anteriormente pueden producirse utilizando vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos monoclonales y células hospedadoras que comprenden dichos vectores.

Procedimientos de preparación de anticuerpos contra TFPI

- 15 El anticuerpo monoclonal puede producirse en una célula hospedadora de manera recombinante, expresando una secuencia de nucleótidos que codifica las regiones variables del anticuerpo monoclonal de acuerdo con las realizaciones de la invención. Con la ayuda de un vector de expresión, un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos puede transfectarse y expresarse en una célula hospedadora adecuada para la producción. Por consiguiente, también se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal que se une con el TFPI humano que comprende:

- 20 (a) transfectar, en una célula hospedadora, una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal de la invención,
- (b) cultivar la célula hospedadora para expresar el anticuerpo monoclonal en la célula hospedadora, y opcionalmente
- 25 (c) aislar y purificar el anticuerpo monoclonal producido, en el que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal de la presente invención.

- En un ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud total o parcial obtenidas mediante técnicas convencionales de biología molecular, se insertan en vectores de expresión, de modo que los genes se unen operativamente a las secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, La expresión "unido operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de tal manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con la expresión de la célula hospedadora utilizada. El gen de la cadena ligera y el gen de la cadena pesada del anticuerpo puede insertarse en vectores distintos o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión por procedimientos convencionales (por ejemplo, por ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o por ligamiento del extremo como si no hay sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden utilizarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del isotipo deseado, de modo que el segmento V_H está unido operativamente al (los) segmento (s) C_H dentro del vector y el segmento V_L está unido operativamente al segmento C_L dentro del vector. Además, o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal se una en fase al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

- Además de los genes que codifican la cadena de anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpos en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpos. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Los expertos en la materia entenderán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, del nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los ejemplos de secuencias reguladoras para la expresión de células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos,

tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Como alternativa, pueden utilizarse secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de la β -globina.

Además de los genes de la cadena de anticuerpos y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 4.399.216 4.634.665 y 5.179.017, todas ellas de Alex y col.). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los ejemplos de genes marcadores de selección incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector (o vectores) de expresión que codifica las cadenas pesada y ligera se transfecta en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y técnicas similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente, en células hospedadoras de mamíferos, es la más preferida debido a que dichas células eucariotas, y en particular células de mamíferos, son más propensas que las células procariotas a ensamblar y segregar un anticuerpo plegado correctamente e inmunológicamente activo.

Los ejemplos de células hospedadoras de mamíferos para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, Como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células NSO de mieloma, células COS, células HKB11 y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando procedimientos convencionales de purificación de proteínas, tales como ultrafiltración, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y centrifugación.

Uso de secuencias parciales de antibióticos para expresar anticuerpos intactos

Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácidos que se encuentran en las seis CDR de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias de la CDR son responsables de la mayoría de las interacciones entre el anticuerpo y el antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de los anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (ver, por ejemplo, Riechmann, L. y col., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. y col., 1986, Nature 321:522-525; y Queen, C. y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033). Dichas secuencias estructurales pueden obtenerse en bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión V(D)J durante la maduración de los linfocitos B. Para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962), no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular. Típicamente, para este fin, la secuencia parcial de las cadenas pesada y ligera que abarca las regiones CDR es suficiente. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué variable de la línea germinal y qué segmentos de genes de unión contribuyeron a los genes de la región variable del anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se utiliza para completar las partes que faltan de las regiones variables. Las secuencias líder de las cadenas pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Por este motivo, para las construcciones de expresión, es necesario utilizar la secuencia líder de la línea germinal correspondiente. Para añadir secuencias que faltan, las secuencias de ADN clonadas pueden combinarse con oligonucleótidos sintéticos mediante ligamiento o amplificación por PCR. Como alternativa, para crear un clon de región variable completamente sintético, toda la región variable puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes y combinados, mediante amplificación por PCR. Este procedimiento tiene ciertas ventajas, tales como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, o la optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de los transcritos de las cadenas pesadas y ligeras se utilizan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras sintéticas pueden diferenciarse de las secuencias naturales de tres maneras: series de bases de nucleótidos repetidas se

interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios de inicio de la traducción óptimos de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); y mediante ingeniería genética se diseñan sitios de endonucleasas de restricción en dirección 5' de los sitios de inicio de la traducción.

- 5 Para las regiones variables tanto de cadena pesada como de cadena ligera, las secuencias de cadena codificantes, y las no codificantes correspondientes, optimizadas, se dividen en 30-50 secciones de nucleótidos en aproximadamente el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblar en conjuntos bicatenarios solapantes que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Después, los grupos se utilizan luego como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos.
- 10 Típicamente, un conjunto de oligonucleótidos de una sola región variable se dividirá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes se combinan después mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de la cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones de vectores de expresión.
- 15 Las regiones variables de la cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan después con secuencias promotoras clonadas, de inicio de la traducción, de región constante, del extremo 3' no traducido, de poliadenilación y de terminación de la transcripción, para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie, o transfectarse individualmente en células hospedadoras y después fusionarse para formar una célula hospedadora que exprese ambas cadenas.
- 20

Por tanto, en otro aspecto, las características estructurales de un anticuerpo anti TFPI humano, se utilizan para crear anticuerpos anti TFPI humanos relacionados estructuralmente que conserven la función de unión al TFPI. Más específicamente, para crear anticuerpos adicionales de la invención, anti TFPI humanos, modificados de forma recombinante por ingeniería genética, una o más CDR de las regiones de cadena pesada y ligera, específicamente identificadas de los anticuerpos monoclonales de la invención, pueden combinarse de forma recombinante con regiones estructurales humanas y CDR conocidas.

25

Composiciones farmacéuticas

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo monoclonal anti TFPI y un transportador farmacéuticamente aceptable. Un "transportador farmacéuticamente aceptable" es una sustancia que puede añadirse al principio activo para ayudar a formular o a estabilizar la preparación y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente. Los expertos en la materia conocen bien ejemplos de dichos transportadores e incluyen agua, azúcares, tales como maltosa o sacarosa, albúmina, sales, tales como cloruro de sodio, etc. Por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin, se describen otros transportadores. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal anti TFPI. En algunas realizaciones, dichas composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales anti TFPI. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un anticuerpo que se une específicamente al dominio 1 de Kunitz, como se describe anteriormente, y un anticuerpo que se une específicamente al dominio 1 y 2 de Kunitz, como se describe anteriormente.

30

35

40 Para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables, los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles. En la materia se conoce el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Preferentemente, la composición se formula para inyección parenteral. La composición puede formularse como una solución, una microemulsión, un liposoma, o cualquier otra estructura solicitada, que sea adecuada para contener una alta concentración de fármaco. El transportador puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. En algunos casos, en la composición se incluirán agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio.

45

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, con uno o una combinación de los principios enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros principios requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos procedimientos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier principio adicional deseado de una de sus soluciones anteriormente esterilizadas por filtración.

50

55

Usos farmacéuticos

El anticuerpo monoclonal puede utilizarse con fines terapéuticos para tratar deficiencias o defectos genéticos y

adquiridos en la coagulación. Por ejemplo, en las realizaciones descritas anteriormente, los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para bloquear la interacción de TFPI con FXa, o para impedir la inhibición, dependiente de TFPI, de la actividad de TF/FVIIa. Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal también puede utilizarse para restaurar la generación de FXa dirigida por TF/FVIIa para eludir la insuficiencia de la amplificación de FXa dependiente de FVIII o FIX.

Los anticuerpos monoclonales tienen uso terapéutico en el tratamiento de trastornos de hemostasia, tales como trombocitopenia, trastornos plaquetarios y trastornos hemorrágicos (por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B y hemofilia C). Dichos trastornos pueden tratarse administrando, a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti TFPI. Los anticuerpos monoclonales también tienen uso terapéutico en el tratamiento de hemorragias incontroladas en indicaciones tales como traumatismo e ictus hemorrágico. Por tanto, también se proporciona un procedimiento para reducir el tiempo de sangrado, que comprende administrar, a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti TFPI de la invención.

Los anticuerpos pueden utilizarse como monoterapia o en combinación con otras terapias para tratar un trastorno hemostático. Por ejemplo, se cree que la administración conjunta de uno o más anticuerpos de la invención con un factor de coagulación tal como el factor VIIa, factor VIII o factor IX, es útil para tratar la hemofilia. En una realización, se proporciona un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación, que comprende administrar (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une al inhibidor de la ruta del factor tisular humano y (b) una segunda cantidad de factor VIII o factor IX, en el que dichas primera y segunda cantidades juntas son eficaces para tratar dichas deficiencias o defectos. En otra realización, se proporciona un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación, que comprende administrar (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une al inhibidor de la ruta del factor tisular humano y (b) una segunda cantidad de factor VIII o factor IX, en el que dichas primera y segunda cantidades juntas son eficaces para tratar dichas deficiencias o defectos, y además en el que el factor VII no se administra conjuntamente. La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación de un anticuerpo monoclonal de la invención y el factor VIII o factor IX, en el que la composición no contiene factor VII. El "factor VII" incluye el factor VII y el factor VIIa. Probablemente, estas terapias de combinación pueden reducir la frecuencia de infusión necesaria del factor de coagulación. Por coadministración o terapia de combinación se entiende la administración de los dos fármacos terapéuticos, cada uno formulado por separado o formulado conjuntamente en una composición, y, cuando se formulan por separado, se administran ya sea aproximadamente al mismo tiempo, o a diferentes momentos, pero durante el mismo período terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral a sujetos que padecen hemofilia A o B a una dosis y frecuencia que puede variar con la gravedad del episodio de sangrado o, en el caso de terapia profiláctica, puede variar con la gravedad de la deficiencia de coagulación del paciente.

Las composiciones pueden administrarse a pacientes que lo necesiten como un bolo o por infusión continua. Por ejemplo, una administración en bolo de un anticuerpo de la invención presente como un fragmento Fab puede estar en una cantidad de 0,0025 a 100 mg/kg de peso corporal, de 0,025 a 0,25 mg/kg, de 0,010 a 0,10 mg/kg o de 0,10-0,50 mg/kg. Para la infusión continua, un anticuerpo de la invención presente como un fragmento Fab puede administrarse a de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal/minuto, de 0,0125 a 1,25 mg/kg/min., de 0,010 a 0,75 mg/kg/min., de 0,010 a 1,0 mg/kg/min. o de 0,10-0,50 mg/kg/min. durante un período de 1-24 horas, 1-12 horas, 2-12 horas, 6-12 horas, 2-8 horas o 1-2 horas. Para la administración de un anticuerpo de la invención presente como un anticuerpo de longitud completa (con regiones constantes completas), las cantidades de dosificación pueden ser de aproximadamente 1-10 mg/kg de peso corporal, 2-8 mg/kg o 5-6 mg/kg. Típicamente, dichos anticuerpos de longitud completa se administrarían por infusión durante un período de treinta minutos a tres horas. La frecuencia de la administración dependerá de la gravedad de la afección. La frecuencia puede variar de tres veces por semana a una vez cada dos o tres semanas.

Adicionalmente, las composiciones pueden administrarse a los pacientes mediante inyección subcutánea. Por ejemplo, a los pacientes se les puede administrar una dosis de 10 a 100 mg de anticuerpo anti TFPI mediante inyección subcutánea semanal, quincenal o mensual.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti TFPI o de una combinación de dicho anticuerpo y factor VIII o factor IX, que se necesita para aumentar de manera eficaz el tiempo de coagulación *in vivo* o de lo contrario causar un beneficio medible *in vivo* a un paciente que lo necesite. La cantidad exacta dependerá de numerosos factores, incluyendo, pero sin limitación, los componentes y las características físicas de la composición terapéutica, la población de pacientes a la que se dirige, las cuestiones individuales del paciente, y factores similares, y puede determinarla fácilmente un experto en la materia.

Ejemplos

Ejemplo 1. Expresión y purificación de TFPI (dominio 2 de Kunitz) recombinante de *E. coli*.

Sistema de expresión

Para la expresión de la proteína de fusión, que consiste en His₁₀/NusA, y la proteína de interés, se utilizó el vector de destino (según la nomenclatura de Gateway), denominado pD Eco5 N. El vector pD Eco5 N se basa en el pET-16b (Novagen), y adicionalmente codifica una etiqueta de 10 histidinas (His₁₀) y NusA, así como un casete de clonación Gateway.

- 5 Una construcción de TFPI que codificaba un sitio de escisión de trombina fusionado con el extremo N del dominio 2 de Kunitz (de Lys93 a Phe154, referencia Uniprot 10646) y los sitios de conexión Gateway (attB1-5#, attB2-3#, Invitrogen), se clonó en el vector pD Eco5 N dando como resultado el vector de expresión denominado pD Eco5 N TFPI KD2. Se utilizó la cepa de expresión BL21 DE3 (Novagen).

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión expresada utilizando pD Eco5 N TFPI KD2, 600AA

```
MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY
EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVDDEV T QPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES
VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE
AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE
VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN
PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM
TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD
EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL
AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSLVPRGSKP
DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM NNFETLEECK NICEDGPNGF
```

Componentes de las secuencias

Etiqueta His 10: MGHHHHHHHH HH

Etiqueta NusA: SSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY
EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVDDEV T QPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES
VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE
AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE
VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN
PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM
TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD
EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL
AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEA

Enlazador/sitos de restricción de endonucleasas traducidas:
TSGS GLE

Sitio att traducido:
TSLYKKA GS

Sitio de trombina:
LVPRGS

Kunitz 2 del TFPI
GSLVPRGSKP DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM NNFETLEECK
NICEDGPNGF

Expresión

Una cepa BL21 DE3 transformada con pD Eco5 N #209, se cultivó como un precultivo en medio LB 2x 50 ml con ampicilina 200 µg/ml durante 14 horas a 37 °C con una velocidad de agitación de 180 rpm. A continuación, cada uno de ocho matraces agitadores con 400 ml de medio Circlegrow (Q-Biogene), se inoculó con 8 ml de precultivo y se incubó a 37 °C, con una velocidad de agitación de 180 rpm. A una densidad de cultivo de DO600, para la inducción génica, se añadió IPTG (a una concentración final de 100 mM) y se cultivó adicionalmente a 17 °C durante 24 horas con una velocidad de agitación de 180 rpm. La *E. coli* se sedimentó por centrifugación (3.000 g, 10 min) y se conservó -80 °C.

Purificación

La masa de *E. coli* sedimentada de 3,2 l de cultivo se resuspendió en 200 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, glicerol al 10 % (p/p), imidazol 40 mM, cóctel inhibidor de proteasa completo sin EDTA (Roche)), se homogeneizó en un dispositivo de alta presión (Microfluidics) y después el lisado se centrifugó (100.000 g, 60 min,

4 °C). Utilizando el sistema Äkta Explorer, se realizaron diversas etapas de purificación. La muestra concentrada se aplicó en una etapa de cromatografía IMAC inicial a dos unidades de 5 ml de la matriz Hi-Trap-Sepharose HP (GE) unidas. El equilibrado, la unión de la proteína de fusión y el lavado de la matriz Hi-Trap-Sepharose HP, se realizó utilizando tampón A (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 40 mM). Para la elución de la proteína de fusión NusA-TFPI, se utilizó un gradiente lineal de imidazol de 40 a 500 mM en tampón B (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM). Las fracciones de elución se agruparon y se concentraron (por un factor de 6-7 utilizando un dispositivo de ultrafiltración Amicon) y el tampón se intercambió a Tris HCl pH 8,0. La muestra concentrada (6-7 ml) se aplicó adicionalmente a cromatografía de exclusión por tamaño utilizando Sephacryl-100 (XK26 / 74) en Tris HCl pH 8,0. Las fracciones del pico principal, que contenían la proteína de fusión, se agruparon y se concentraron por ultrafiltración (Amicon) a un volumen de 5 ml. Se añadió trombina (HTI) a la muestra (proporción de enzima:proteína de fusión de 1:50 p/p), se incubó durante 5 horas a 21 °C y la reacción se detuvo finalmente con PMSF (a una concentración final de 1 mM). Posteriormente, se realizó una segunda etapa de cromatografía por exclusión de tamaño (Sephacryl-100 (XK26/74) en Tris HCl pH 8,0 y las fracciones pico se monitorizaron con PAGE. Las fracciones que contenían el dominio 2 de Kunitz de TFPI monomérico libre, se recogieron y se concentraron (Amicon), produciendo aproximadamente 4 mg de producto de 3,2 l de cultivo de *E. coli*.

Ejemplo 2. Producción de TFPI recombinante (dominio 1 + 2 de Kunitz), expresión en *E. coli* y su purificación

Sistema de expresión

El vector de destino (según la nomenclatura del Gateway), denominado pD Eco5 N se basa en ET-16 b (Novagen). El vector también codifica una etiqueta His₁₀ y NusA, así como el casete de clonación Gateway para la expresión de la proteína de fusión que consiste en His₁₀/NusA y la proteína de interés.

Una construcción de ADN, que codificaba un sitio de escisión de la proteasa del TEV (acrónimo del inglés *tobacco mosaic virus*, virus del mosaico del tabaco), fusionado con el extremo N de los dominios 1+2 de Kunitz (de Asp1 a Phe154, referencia Uniprot 10646, TFPI alfa maduro) y los sitios de conexión Gateway (attB1-5#, attB2-3#, Invitrogen), se clonó en el vector pD Eco5 N, dando como resultado el vector de expresión denominado pD Eco5 N TFPI KD1+2. Se utilizó la cepa de expresión BL21 DE3 (Novagen).

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión expresada utilizando pD Eco5 N TFPI KD1+2, 600 AA

```

SECUENCIA 699 AA; 78579 MW; 4D2932FF7C1E3F7E CRC64;
MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY
EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVDDEV TPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES
VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE
AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE
VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN
PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNgQNVRLAS QLSGWELNVM
TVDDLQAKHQ AEAAHAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD
EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL
AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSDYDIPTTE
NLYFQDSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC KAIMKRFFFN IFTRQCEEFI
YGGCEGNQNR PESLEECKKM CTRDNANRII KTTLQKEKPD FCFLIEDPGI CRGYITRYFY
NQQTKQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

```

Componentes de las secuencias

Etiqueta 10 His: MGHHHHHHHH HH

Etiqueta NusA: SSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY
EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVDDEV TPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES
VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE
AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE
VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN
PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNgQNVRLAS QLSGWELNVM
TVDDLQAKHQ AEAAHAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD
EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL
AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDE

Enlazador/sitos de restricción de endonucleasas traducidas: TSGS GLE

Sitio att traducido: TSLYKKA GS

Sitio TEV: DYDIPTTENLYFQ

Kunitz 1 +2 DSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC KAIMKRFFFN IFTRQCEEFI
del TFPI YGGCEGNQNR FESLEECKKM CTRDNANRII KTTLQQEKPD FCFLEEDPGI CRGYITRYFY
NQQTQQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

Expresión

Una cepa BL21 DE3 transformada con pD Eco5 TFPI KD1+2 se cultivó como un precultivo en medio LB 2x 100 ml con ampicilina 200 µg/ml durante 14 horas a 37 °C con una agitación de 180 rpm. Se inoculó un biorreactor (Sartorius Stedim Biotech) con 10 l de volumen de cultivo (medio LB, ampicilina 200 µg/ml) con 200 ml de precultivo y se incubó a 37 °C, con una agitación de 150 rpm. A una densidad de cultivo de DO600, para la inducción génica, se añadió IPTG (isopropil β-D-tiogalactósido) a una concentración final de 100 mM y se cultivó adicionalmente a 17 °C durante 24 horas con un nivel mínimo pO₂ del 50 % y una velocidad de agitación de 180 - 800 rpm. La *E. coli* se sedimentó por centrifugación (3.000 g, 10 min) y se conservó -80 °C.

Purificación

La masa de *E. coli* sedimentada de 10 l de cultivo se resuspendió en 500 ml de tampón de lisis [Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, glicerol al 10 % (p/p), imidazol 40 mM, cóctel inhibidor de proteasa completo sin EDTA (Roche)], se homogeneizó en un dispositivo de alta presión (Microfluidics) y después el lisado se centrifugó (100.000 g, 60 min, 4 °C). Utilizando el sistema de purificación Äkta, se realizaron diversas etapas de purificación. La fracción de lisado soluble centrifugada, se aplicó en una etapa de cromatografía IMAC inicial a una columna que contenía 50 ml de la matriz Ni-Sepharose HP (GE). El equilibrado, la unión de la proteína de fusión y el lavado de la matriz Hi-Trap-Sepharose HP, se realizó utilizando tampón A (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 40 mM). Para la elución de la proteína de fusión NusA-TFPI, se utilizó un gradiente lineal de imidazol de 40 a 500 mM en tampón B (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM). Las fracciones de elución se agruparon (a un volumen total de 140 ml) y se aplicaron en fracciones a una columna desalinizadora Hi Prep 26/10 (GE) (dos unidades de columna unidas) para intercambiar a un tampón con Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Para retirar la etiqueta Nus A, se realizó una digestión proteolítica con TEV etiquetada con His₆, a una relación de enzima:proteína de fusión de 1:66 p/p, durante 16 horas a 4 °C. La muestra se aplicó de nuevo a una columna de la matriz de Ni-Sepharose HP (GE), que contenía 50 ml, para separar el TFPI libre de la proteína de fusión no escindida y His-TEV. Después, el eluato de la etapa IMAC se aplicó a una cromatografía por exclusión de tamaño, (SEC, columna S100, GE) para aislar una fracción de TFPI monomérico, que se concentró por ultrafiltración (Amicon, unidad con un intervalo límite de 3 kDa) a aproximadamente 1,5 mg/ml. La muestra final purificada del dominio 1+2 de Kunitz de TFPI se desarrolló como una doble banda en PAGE con un peso molecular aparente de aproximadamente 18 kDa. Un análisis adicional (SEC, transferencia de Western) reveló que solo la proteína correspondiente a la banda superior era inmunorreactiva con el Fab B.

Ejemplo 3. Procesamiento proteolítico y purificación de Fab B de la IgG1 humana.

Expresión

El Fab B se procesó proteolíticamente de su forma de IgG1 humana. El Fab B_IgG1 se expresó en células de mamíferos (HEK 293) como una proteína de secreción. Para el aislamiento de la IgG1, 1,6 l de sobrenadante de cultivo se aplicaron a dos columnas de HiTrap MabSelectSuRE unidas (de GE, volumen de lecho de 5 ml, caudal de 1,5 ml/min, 4 °C, durante 16 horas). Para el lavado y el equilibrado de las columnas, se utilizó un tampón que consistía en PBS y NaCl 500 mM. La IgG1 unida se eluyó (acetato de sodio 50 mM, NaCl 500 mM, pH 3,5 seguido del mismo tampón a pH 3,0), se neutralizó (Tris 2,5 M > 11) y se concentró por ultrafiltración a aproximadamente 13 mg/ml.

Para digerir aproximadamente 270 mg (en 12,5 ml) de IgG1, se utilizó papaína inmovilizada (Pierce, suspensión de 20 ml), utilizando 22 fracciones en tubos de reacción Eppendorf de 1,5 ml (incubación durante 16 horas a 37 °C, agitación a 1400 rpm). Después de procesar las muestras, estas se centrifugaron, el sobrenadante se recogió, el sedimento se lavó con PBS y tanto los sobrenadantes como el lavado aclarado se agruparon.

La muestra digerida se aplicó de nuevo a dos columnas de HiTrap MabSelectSuRe unidas (2x5 ml) permitiendo la separación de material Fc y Fab. Las fracciones aisladas y agrupadas de Fab B se concentraron por ultrafiltración a aproximadamente 8 mg/ml (rendimiento total de 120 mg). Adicionalmente, Para una purificación adicional, se utilizó cromatografía por exclusión de tamaño con Superdex75 (columna 26/60, caudal 2,5 ml/min con PBS). Después de una concentración adicional y una filtración estéril, el rendimiento final del Fab B fue de 115 mg a una concentración de 8,5 mg/ml.

Para demostrar la formación del complejo Fab B/TFPI KD1+2 (Figura 1), se utilizó cromatografía analítica por exclusión de tamaño (sistema Äkta Micro, columna S75 5/150, Tris HCl 100 mM, pH 7,5). Para Fab B se observó un tiempo de retención inesperadamente largo en la columna SEC correspondiente a un peso molecular aparente de 20 kDa, que es muy similar al peso molecular detectado para TFPI KD1+2.

5 Ejemplo 4. Producción del complejo dominio 1+2 de Kunitz del TFPI con Fab B

Para formar el inmunocomplejo, el dominio 1+2 de Kunitz del TFPI y el Fab B se combinaron en una proporción de aproximadamente 1: 1,5 (p/p). Por lo tanto, se mezclaron 3,85 mg de la proteína monomérica, concentrada del dominio 1+2 de Kunitz del TFPI (de las fracciones agrupadas de S100) con 7,4 mg de Fab B (de SEC Superdex75) y se incubaron durante 16 horas a 21 °C. La formación del complejo se demostró mediante SEC analítica (S200/150) y transferencia de Western. El complejo se purificó adicionalmente por SEC (S200 26/26) en Tris HCl 10 mM, pH 7,4 con NaCl 150 mM, concentrado por ultrafiltración (Amicon, unidad con un intervalo límite de 5 kDa) a 10,3 mg/mF, que se utilizó para la cristalización.

Ejemplo 4. Cristalización y determinación de la estructura por rayos X del complejo TFPI-Fab B

Cristalización

Utilizando el procedimiento de gota asentada, se hicieron crecer co-cristales, a una temperatura de 4 °C, de una construcción de proteína que comprendía el dominio 1 de Kunitz (KD1) y el dominio 2 de Kunitz (KD2) del TFPI y el anticuerpo monoclonal Fab B contra TFPI. El complejo de proteína se concentró a 10 mg/ml y se cristalizó mezclando los mismos volúmenes de solución de proteína y solución de pocillo (PEG8000 al 20 %) como precipitante. Los cristales aparecieron después de tres días.

20 *Recogida y procesamiento de datos*

Los cristales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido en glicerol al 30 % en un tampón de cristalización para la crioprotección. Los datos de un cristal se recogieron en la línea de haz BL14.1, del sincrotrón BESSY (Berlín) en un detector MAR CCD. Los datos se indexaron e integraron con IMOSFLM (A.G.W. Leslie, (1992), Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26), se prepararon para su adaptación con POINTLESS (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82), y se adaptaron con SCALA (P.R. Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82). El cristal difractó hasta 2,3 Å y poseía el grupo espacial P2₁ con las constantes de celda $a = 80,3$, $b = 71,9$, $c = 108,8$; $\beta = 92,5^\circ$ y dos complejos TFPI-KD1, -KD2 - Fab en la unidad asimétrica.

Determinación y refinado de la estructura

La coestructura de TFPI-KD1, -KD2 y el anticuerpo monoclonal Fab se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando PHASER (A.J. McCoy y col. (2007) J. Appl. Cryst. 40, 658-674), MOLREP (A.Vagin y A.Teplyakov (1997) J. Appl. Cryst. 30, 1022-10) y estructuras internas y publicadas de rayos X de TFPI-KD2 (código pdb 1tfx) y un fragmento Fab (código pdb 1w72) como modelos de búsqueda. Antes de la sustitución molecular, los modelos Fab y KD1 se procesaron con CHAINSAW (N. Stein, (2008) J. Appl. Cryst. 41, 641 - 643). El modelo se completó con rondas iterativas de construcción de modelos con COOT (P. Emsley y col. (2010) Acta Cryst. D66: 486-501) y el refinamiento de máxima verosimilitud usando REFMAC5.5 (G.N. Murshudov y col. (1997) Acta Cryst. D53, 240-255). La región hc_Ser131-hc_Ser136 de ambos Fab, los restos Asp1-Leu21, Asp149-Phe154 del TFPI, y los restos Arg78-Glu92 enlazadores de KD1-KD2, mostraron una densidad electrónica débil y no se incluyeron en el modelo. En la Tabla 1 se resume el conjunto de datos y las estadísticas de refinamiento.

Tabla 1. Conjunto de datos y estadísticas de refinamiento del complejo TFPI-Fab B.

Longitud de onda	0,9184 Å
Resolución (protección más alta)	47-2,3 (2,4-2,3) Å
Reflexiones (observadas/únicas)	165457 (56223)
Integridad ^a	97,8 % (97,8 %)
I/ σ^a	5,8 (2,0)
R _{combinado} ^{a,b}	0,13 (0,52)
R _{combinado} ^{a,b}	
Grupo espaciador	P2 ₁
Parámetros de celda unitaria	
<i>a</i>	80,3 Å
<i>b</i>	71,9 Å
<i>c</i>	108,8 Å
β	92,5°
R _{crist} ^c	0,20
R _{libre} ^d	0,27
Factor de temperatura de Wilson	16,7 Å ²
Longitud de enlace RMSD ^e	0,008 Å

(continuación)

Ángulos de enlace RMSD	1,3°
Átomos de proteína	8205
Moléculas de agua	599

^a Los valores entre paréntesis son para la protección de alta resolución.

^b $R_{\text{combinado}} = \sum hkl |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum hkl \langle I_{hkl} \rangle$ siendo I_{hkl} la intensidad de reflexión hkl y $\langle I_{hkl} \rangle$ la intensidad promedio de múltiples observaciones.

^c $R_{\text{crist}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$ siendo F_{obs} y F_{calc} las amplitudes del factor de estructura observada y calculada, respectivamente.

^d conjunto de ensayo al 5 %

^e RMSD, desviación cuadrática media (acrónimo del inglés *root mean square deviation*) del conjunto de parámetros para la estereoquímica ideal

Ejemplo 5. Mapeo epitópico basado en estructura de rayos X

El complejo de TFPI-KD1, -KD2 y Fab B (Figura 2), cristalizó como dos copias del complejo por unidad asimétrica. Las cadenas principales de los complejos se superponen con una RMSD global de 1,0 Å con cada Fab B unido al epítipo del TFPI-KD1 y -KD2 asociado. Ambos dominios de Kunitz interaccionan directamente o a través de interacciones mediadas por agua con Fab B. KD1 y KD2 también interaccionan entre sí. Los restos de TFPI en contacto con Fab B (el epítipo) y la superficie oculta respectiva se analizaron con el programa CCP4 AREAIMOL (P.J. Briggs (2000) CCP4 Newsletter No. 38). Los restos con un mínimo de 5 Å² de superficie oculta o más del 50 % de la superficie oculta se han considerado como que están en contacto (Tabla 2). Los restos de Fab B en contacto con TFPI (el paratopo) y la superficie oculta respectiva se analizaron con AREAIMOL. Los restos con un mínimo de 5 Å² de superficie oculta o más del 50 % de la superficie oculta se han considerado como que están en contacto (Tabla 3).

Tabla 2: Restos de TFPI en contacto con Fab B. Las cadenas C, D y las cadenas N, O corresponden a los dominios 1 y 2 de Kunitz del TFPI del complejo respectivo en la unidad asimétrica.

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Phe C 28	3,4	4,1
Asp C31	26,2	47,3
Asp C 32	6,8	73,9
Gly C 33	7,6	100,0
Pro C 34	87,2	97,2
Cys C 35	45,7	93,4
Lys C 36	139,6	72,4
Ala C 37	0,9	2,2
Ile C 38	3,0	2,1
Cys C 59	11,3	34,7
Glu C 60	83,9	60,4
Gly C 61	0,5	1,4
Asn C 62	4,1	11,2

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Glu D 100	83,2	53,9
Glu D 101	80,8	93,4
Pro D 103	57,4	85,7
Gly D 104	16,6	68,3
Ile D 105	11,4	61,2
Cys D 106	12,5	32,2
Arg D 107	116,8	73,2
Gly D 108	18,6	49,4
Tyr D 109	133,5	74,6
Phe D 114	8,5	72,0
Asn D 116	8,3	24,5
Glu D 123	45,5	56,5

(continuación)

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Arg D 124	9,9	6,0
Phe D 125	0,1	0,9
Lys D 126	29,2	39,0
Tyr D 127	1,3	7,1
Gly D 128	6,5	67,0

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Lys N 29	1,1	1,2
Asp N 31	28,9	49,4
Asp N 32	10,2	91,8
Gly N 33	12,5	100,0
Pro N 34	87,9	97,2
Cys N 35	42,1	86,0
Lys N 36	142,5	74,2
Ile N 38	4,3	3,2
Cys N 59	11,9	38,5
Glu N 60	71,7	53,0
Gly N 61	0,4	1,0
Asn N 62	7,0	20,2

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Glu O 100	65,1	44,3
Glu O 101	84,8	97,0
Pro O 103	60,2	84,0
Gly O 104	13,6	64,7
Ile O 105	11,6	67,4
Cys O 106	12,7	37,0
Arg O 107	101,3	69,1
Gly O 108	19,7	52,5
Tyr O 109	139,6	76,4
Thr O 111	0,1	0,1
Phe O 114	11,5	78,2
Asn O 116	13,4	34,6
Glu O 123	24,1	35,9
Arg O 124	11,1	6,7
Phe O 125	0,1	1,2
Lys O 126	35,0	52,6
Tyr O 127	1,2	8,1
Gly O 128	6,4	58,1

Tabla 3: Restos de Fab B en contacto con TFPI. Las cadenas A, B y las cadenas L, M representan las cadenas ligera y pesada de Fab B del complejo respectivo en la unidad asimétrica.

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Leu A 27	1,8	39,1
Arg A 28	20,7	13,5
Asn A 29	44,6	38,6
Tyr A 30	56,0	57,7
Tyr A 31	96,9	76,7
Tyr A 48	43,0	75,8
Tyr A 49	39,2	90,7

(continuación)

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Asp A 50	16,5	56,7
Asn A 52	10,3	16,8
Pro A 54	10,4	34,2
Ser A 55	5,0	3,9
Asn A 65	6,3	13,4
Trp A 90	19,2	45,9
Asp A 92	13,6	10,2
Gly A 93	8,7	37,8
Gln B 1	12,6	6,8
Gly B 26	29,6	58,6
Phe B 27	21,1	57,9
Thr B 28	56,9	65,0
Arg B 30	32,0	19,2
Ser B 31	52,2	65,9
Tyr B 32	54,0	94,9
Arg B 52	8,0	6,2
Arg B 98	7,0	49,2
Tyr B 100	92,2	98,6
Arg B 101	106,6	71,6
Tyr B 102	80,2	79,4
Trp B 103	21,7	87,7
Asp B 105	15,3	42,6
Tyr B 106	13,7	15,2

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Leu L 27	4,2	61,7
Arg L 28	22,2	15,5
Asn L 29	43,0	33,6
Tyr L 30	58,2	67,3
Tyr L 31	103,4	80,3
Tyr L 48	48,7	83,8
Tyr L 49	37,5	88,8
Asp L 50	15,5	59,1
Asn L 52	8,6	14,8
Pro L 54	12,9	45,4
Ser L 55	9,8	8,0
Asn L 65	3,9	7,7
Gly L 67	0,1	0,3
Trp L 90	20,3	48,3
Asp L 92	1,9	1,5
Gly L 93	18,4	49,4
Val M 2	1,6	4,3
Gly M 26	34,2	62,2
Phe M 27	18,2	62,1
Thr M 28	64,4	69,7
Arg M 30	27,1	18,8
Ser M 31	51,5	63,7
Tyr M 32	55,3	95,3
Arg M 52	7,4	6,2
Arg M 98	8,5	57,0
Tyr M 100	86,9	98,3
Arg M 101	110,8	74,4
Tyr M 102	82,8	81,0
Trp M 103	18,5	91,1

(continuación)

Resto Nr	superficie oculta en Å ²	superficie oculta en %
Asp M 105	17,3	48,7
Tyr M 106	13,5	15,0

5 El Fab B reconoció un epítipo no lineal de KD1 y KD2 que se define por los restos Asp31 - Lys36, Cys59 (que forma un puente disulfuro con Cys35), Glu60 y Asn62 de TFPI-KD1 y Glu100, Glu101, La región Pro103 - Cys106 (que forma un puente disulfuro con Cys130), los restos Arg107- Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, y los restos Lys126 - Gly128 de TFPI-KD2. El paratopo en Fab B que interacciona con TFPI-KD1 incluye lc_Leu27- lc_Tyr31, lc_Asp50, lc_Asn65, lc_Trp90, lc_Asp92, lc_Gly93, y hc_Arg101 y hc_Tyr102. El paratopo en Fab B que interacciona con TFPI-KD2 incluye lc_Tyr31, lc_Tyr48 y lc_Tyr49, y hc_Thr28, hc_Arg30 - hc_Tyr32, hc_Tyr100, hc_Arg101, hc_Trp103 y hc_Asp105. Las CDR de cadena ligera parecen ser los principales sitios de interacción para TFPI-KD1, las CDR de

10 cadena pesada parecen ser los principales sitios de interacción para TFPI-KD2, basándose en el número de contactos.

El epítipo no lineal en TFPI-KD1 consiste en dos regiones de bucle unidas por un puente disulfuro entre Cys35 y Cys59. El epítipo se caracteriza por una interacción hidrófoba central de Pro34 rodeada por un triángulo de interacciones polares de Asp31, Asp32, Glu60 y Lys36 con Fab B (Figura 3).

15 Pro34 se encuentra en una hendidura hidrófoba creada por lc_Tyr30 y lc_Tyr31 de CDR-L1, lc_Trp90 de CDR-L3 y hc_Tyr102 de CDR-H3. Asp31 y Asp32 poseen interacción polar con CDR-H3 y una red de enlaces de hidrógeno con hc_Arg101, hc_Tyr102, y una molécula de agua. La cadena lateral Hc_Tyr102 está bien orientada para poseer interacción hidrófoba con Pro34, interacción polar con Asn31, e interacción π - π aromática con lc_Trp90 de CDR-L3.

20 La interacción de Asp31 y Asp32 con CDR-H3 es una característica clave del epítipo y las orientaciones e interacciones de hc_Tyr102 y hc_Arg101 parecen ser cruciales. La mutación del resto de tipo silvestre hc_Lys99 a leucina produjo un aumento de afinidad de 20 veces. Hc_Leu99 se encuentra en la interfaz hidrófoba entre la cadena ligera y pesada y está seguido por el bucle CDR-H3. Una cadena lateral de lisina polar y flexible es una desventaja en esta posición e interfiere con la conformación óptima de CDR-H3 y las interacciones de antígeno.

Glu60, que forma el segundo ángulo del triángulo polar, Interacciona con las cadenas laterales de lc_Tyr30 (CDR-L1), lc_Trp90 y el nitrógeno de la cadena principal de lc_Gly93 (CDR-L3).

25 El tercer ángulo del triángulo está formado por Lys36. Lys36 es un resto esencial para la inhibición del complejo de factor VIIa/factor tisular por TFPI (M.S. Bajaj y col. (2001) Thromb Haemost 86(4):959-72.). En complejo con Fab B, Lys36 está significativamente en contacto y oculto por CDR-L1 lc_Leu27, lc_Arg28, lc_Asn29, lc_Tyr31, CDR-L2 lc_Asp50, y una molécula de agua. La interacción de Lys36 con el complejo factor VIIa/factor tisular se produce mientras está unido a Fab B y su inhibición parece excluida.

30 El epítipo no lineal en TFPI-KD2 consiste en tres secciones que comprenden los restos Glu100, Glu101, Pro103 - Tyr109, Phe114; Asn116 y Glu123; Arg124, Lys126 - Gly128. El epítipo KD2 forma interacciones polares e hidrófobas con Fab B CDR-L1, -L2, -H1 y -H3 (Figura 4).

35 Glu100, Glu101, Arg107 y Tyr109 son restos de epítopos clave que proporcionan fuertes puntos de anclaje polares o hidrófobos en contacto con tres regiones de superficie separadas de Fab B creadas por CDR-H1 (interacción con Glu100 y Glu101) CDR-L1, -L2, -H3 (interacción con Arg107), y CDR-L2, -H3 (interacción con Tyr109).

Arg107 está significativamente en contacto por lc_Tyr31, lc_Tyr49, hc_Arg101 y hc_Tyr102 de CDR-L1, -L2, -H3, respectivamente, y además interacciona con Gly33 y Cys35 de KD1. Se ha demostrado que Arg107 es esencial para la inhibición del factor Xa.(M. S. Bajaj y col. (2001) Thromb Haemost 86(4):959-72.). El Fab B ocupa este resto crítico y excluye la función de Arg107 en la inhibición del factor Xa.

40 Glu100 y Glu101 forman enlaces de hidrógeno con los restos de CDR-H1 hc_Arg30, hc_Ser31, y hc_Thr28 y hc_Tyr32.

Tyr109 se encuentra en un nicho hidrófobo creado por los restos CDR-L2 lc_Tyr48, y CDR-H3 hc_Tyr100, y hc_Trp103, y forma un enlace de hidrógeno con hc_Asp105.

Ejemplo 6. Comparación de paratopos de Fab B y su variante optimizada Fab D

45 Para evaluar la consistencia de la unión del epítipo de TFPI por la variante optimizada de Fab B, Fab D, se analizaron alineamientos de secuencia de las cadenas ligeras y pesadas (Figura 7A) y los modelos de homología de Fab D (Figura 7B) para la conservación de los restos paratopicos Fab B en Fab D. Los modelos de homología se calcularon con DS MODELER (ACCELRY, Inc; Fiser, A. y Sali A. (2003) Methods in Enzymology, 374:463-493) utilizando, como estructura de molde de entrada, nuestra estructura de rayos X de TFPI - Fab B. Los modelos de homología muestran conformaciones de esqueleto casi idénticas en comparación con Fab B con RMSD <0,5 Å. De los 29 restos paratopicos

50 observados en el complejo TFPI-Fab B, siete restos (cinco restos de cadena ligera, dos restos de cadena pesada) difieren en Fab D (Figura 7). Lc_Arg28; lc_Asn29, lc_Asp92 y lc_Gly93 muestran las principales interacciones de la

cadena con los restos del epítipo de TFPI. No se espera que los intercambios de estos restos en Fab D induzcan la unión con un epítipo de TFPI diferente. El reemplazo de lc_Tyr48 y hc_Gln1 por una fenilalanina y glutamato en Fab D es insignificante ya que no se observan interacciones de la cadena lateral polar en la estructura de rayos X. Hc_Arg30 muestra una interacción polar con Glu100 de TFPI y se intercambia a una serina en Fab D. En esta posición, una arginina debe ser favorable sobre una serina para interaccionar con TFPI. Basándose en el impacto esperado de los intercambios analizados entre los restos paratópicos de Fab B y los de Fab D, en la conservación de la secuencia global y en la baja RMSD del modelo de homología de Fab D, se contempla que Fab D reconoce el mismo epítipo de TFPI que Fab B.

Ejemplo 7. Fundamentos basados en la estructura de rayos X para la inhibición de la interacción de TFPI con el Factor Xa y el complejo Factor VIIa/factor tisular

Fab B se une tanto a KD1 como a KD2 de TFPI. KD2 se une e inhibe al factor Xa. KD1 se une e inhibe al complejo factor VIIa/factor tisular. Se han descrito las estructuras de rayos X de KD2 en complejo con tripsina (MJ Burgering y col (1997) J Mol Biol. 269 (3): 395-407) y BPTI en complejo con una parte extracelular del TF y factor VIIa (E. Zhang y col (1999) J Mol Biol 285 (5): 2089-104.). La tripsina es un sustituto del factor Xa, BPTI es un homólogo de TFPI-KD1. La superposición del complejo TFPI-Fab B con KD2-tripsina o BPTI-factor VIIa/factor tisular revela que la unión del anticuerpo excluye la unión de KD1 y KD2 con sus ligandos naturales, factor VIIa/factor tisular y factor Xa, respectivamente (Figura 5, Figura 6).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Healthcare LLC Wang, Zhuozhi Murphy, John Marquardt, Tobias Moosmayer, Dieter

<120> Anticuerpos monoclonales contra el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI)

<130> BHC 11 5 001

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 276

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 1

ES 2 722 824 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

ES 2 722 824 T3

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
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

<210> 2
<211> 219
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

5

<400> 2

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala 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 Gln Gln Tyr
85 90 95

ES 2 722 824 T3

Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln 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 Ala
210 215

<210> 3

<211> 225

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Arg Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

ES 2 722 824 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Ser Asp Lys His Trp Gly Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser
225

<210> 4
<211> 212
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Tyr
35 40 45

Tyr Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

ES 2 722 824 T3

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Asp Gly Val Pro Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

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

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 5

<211> 224

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

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

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

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

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

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

ES 2 722 824 T3

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

Ala Arg Leu Tyr Arg Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

<210> 6
<211> 219
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 6
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Arg
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala 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

ES 2 722 824 T3

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

Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln 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> 7
<211> 225
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Arg Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

ES 2 722 824 T3

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Ser Asp Lys His Trp Gly Phe Asp Asp
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
210 215 220

Cys
225

<210> 8
<211> 212
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Lys Tyr Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Phe
35 40 45

Tyr Asp Val Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

ES 2 722 824 T3

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Trp Ser Ser Thr Pro Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

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

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 9

<211> 219

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 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

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

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

ES 2 722 824 T3

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	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	Tyr	Arg	Tyr	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	115	120	125	
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	180	185	190	
Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205	
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys						210	215		

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEQ ID NO: 1),
5 en el que dicho epítipo comprende uno o más restos del dominio 1 de Kunitz, seleccionado del grupo que consiste en Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62, y en el que dicho epítipo comprende uno o más restos del dominio 2 de Kunitz, seleccionado del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly106, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128
y en el que el anticuerpo monoclonal aislado comprende una cadena ligera variable (V_L) de SEQ ID NO: 4 y una
cadena pesada variable (V_H) de SEQ ID NO: 5.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

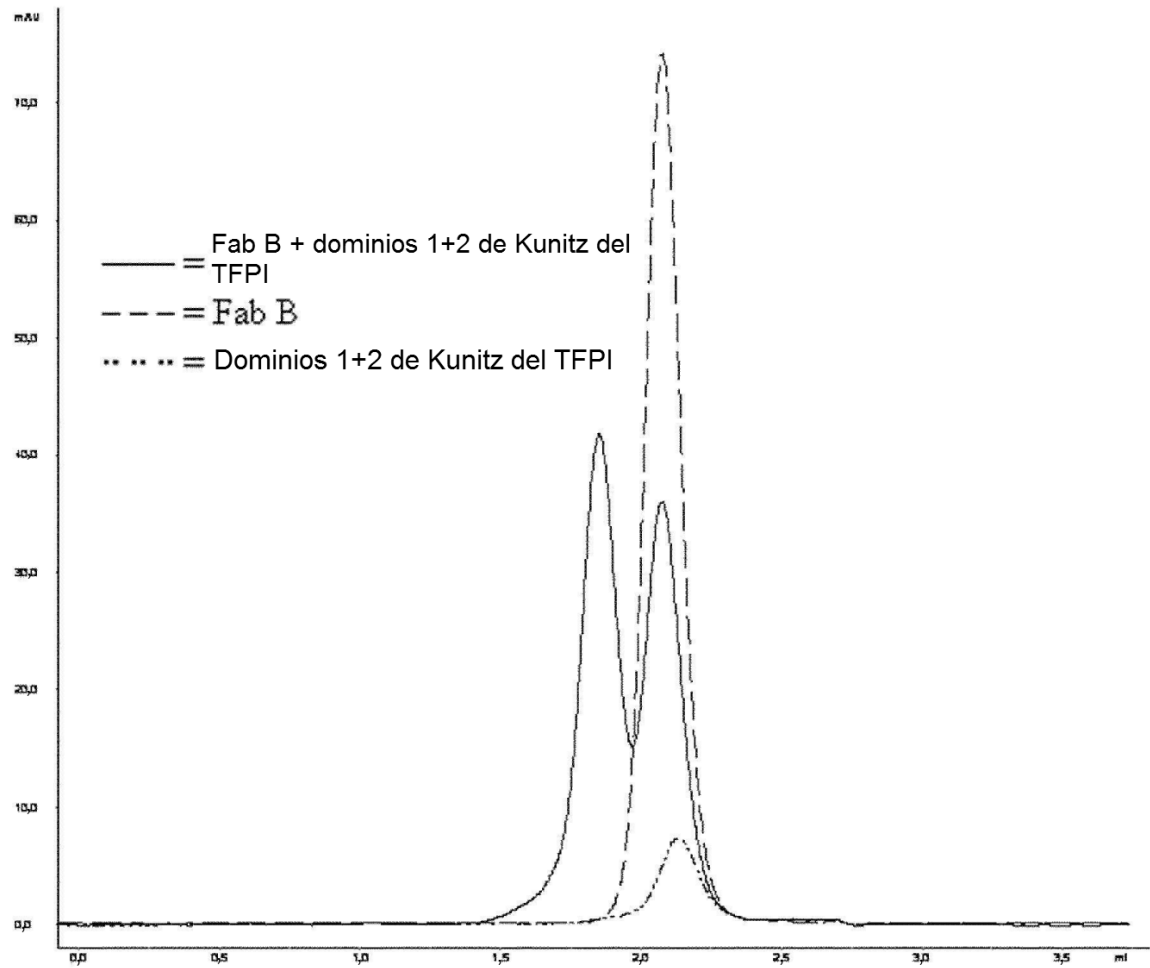


Figura 2

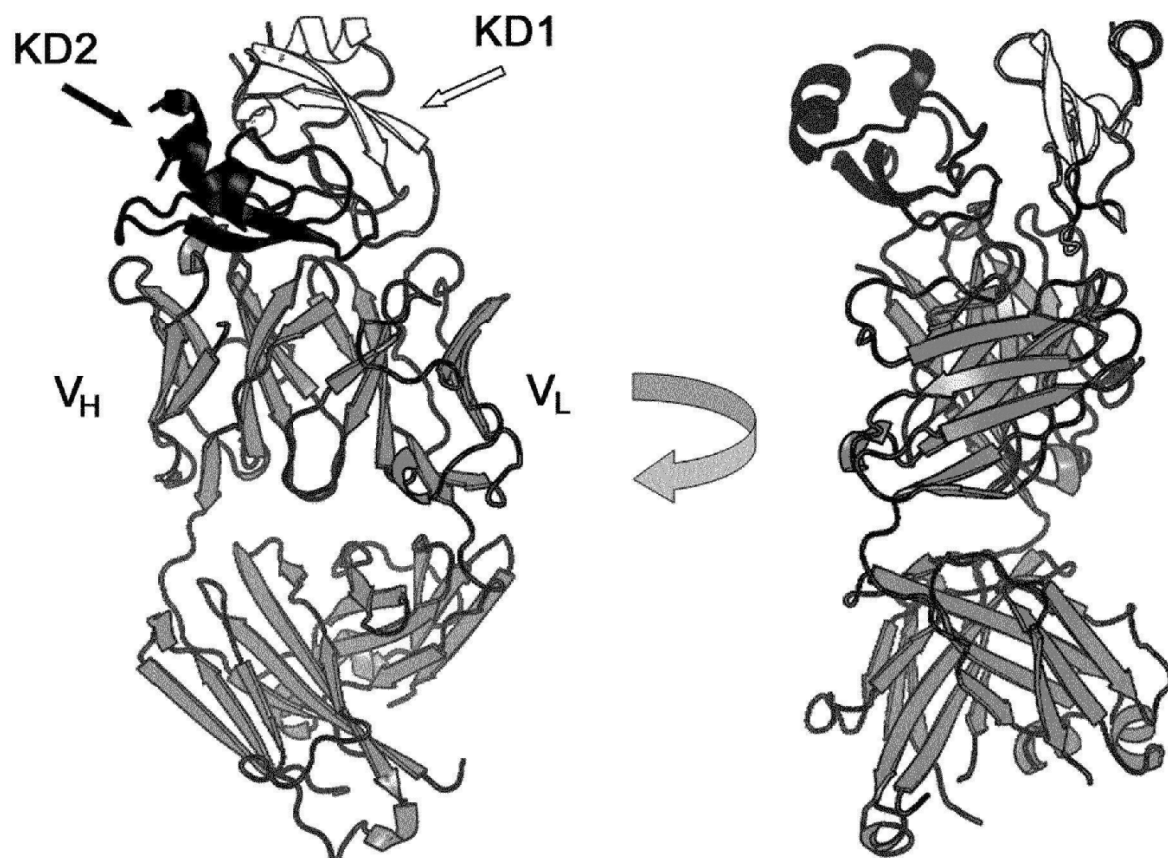


Figura 3

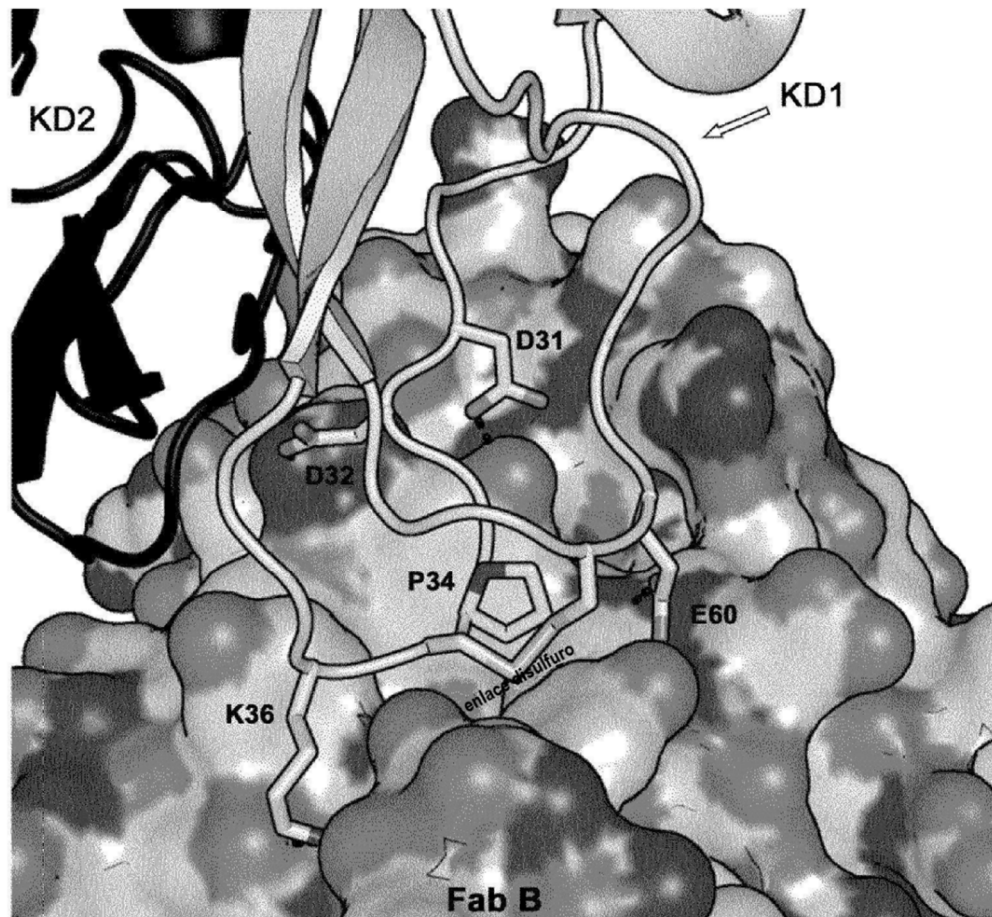


Figura 4

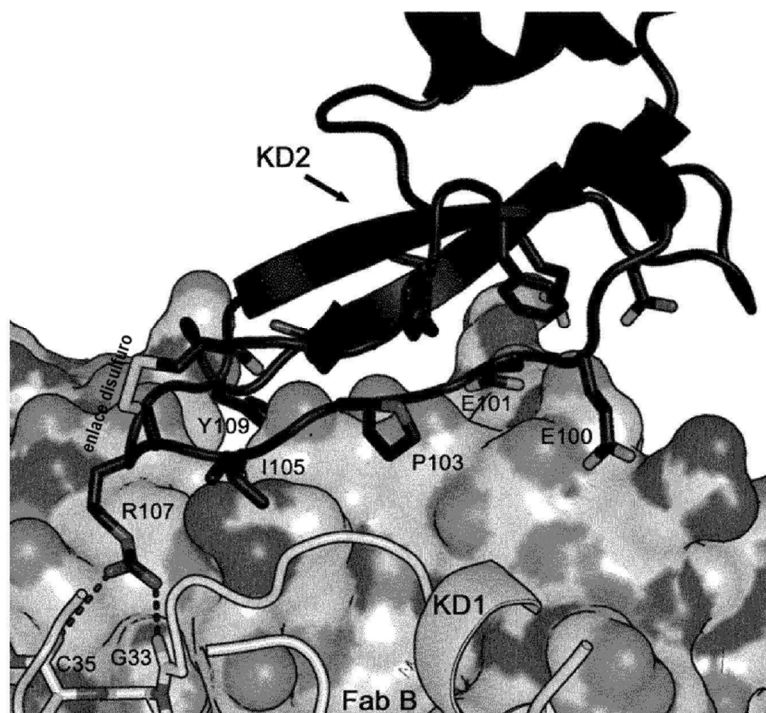
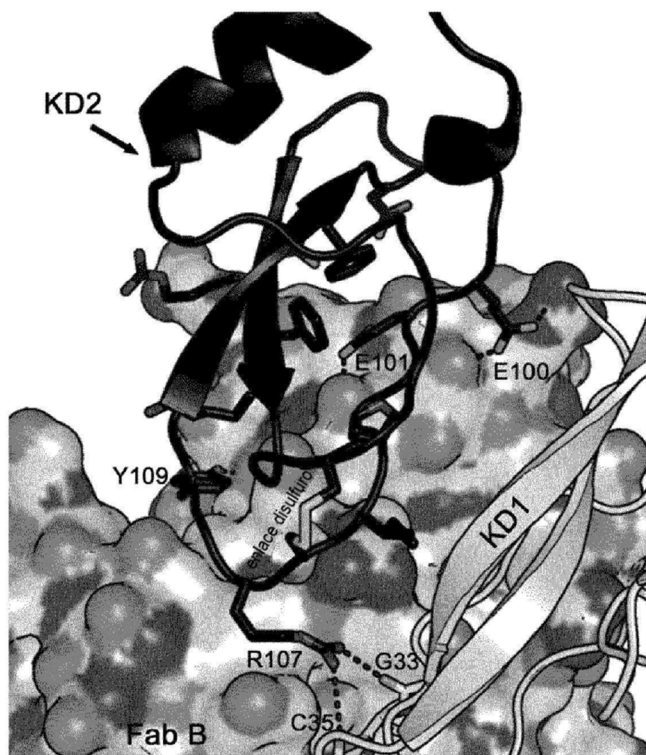


Figura 5

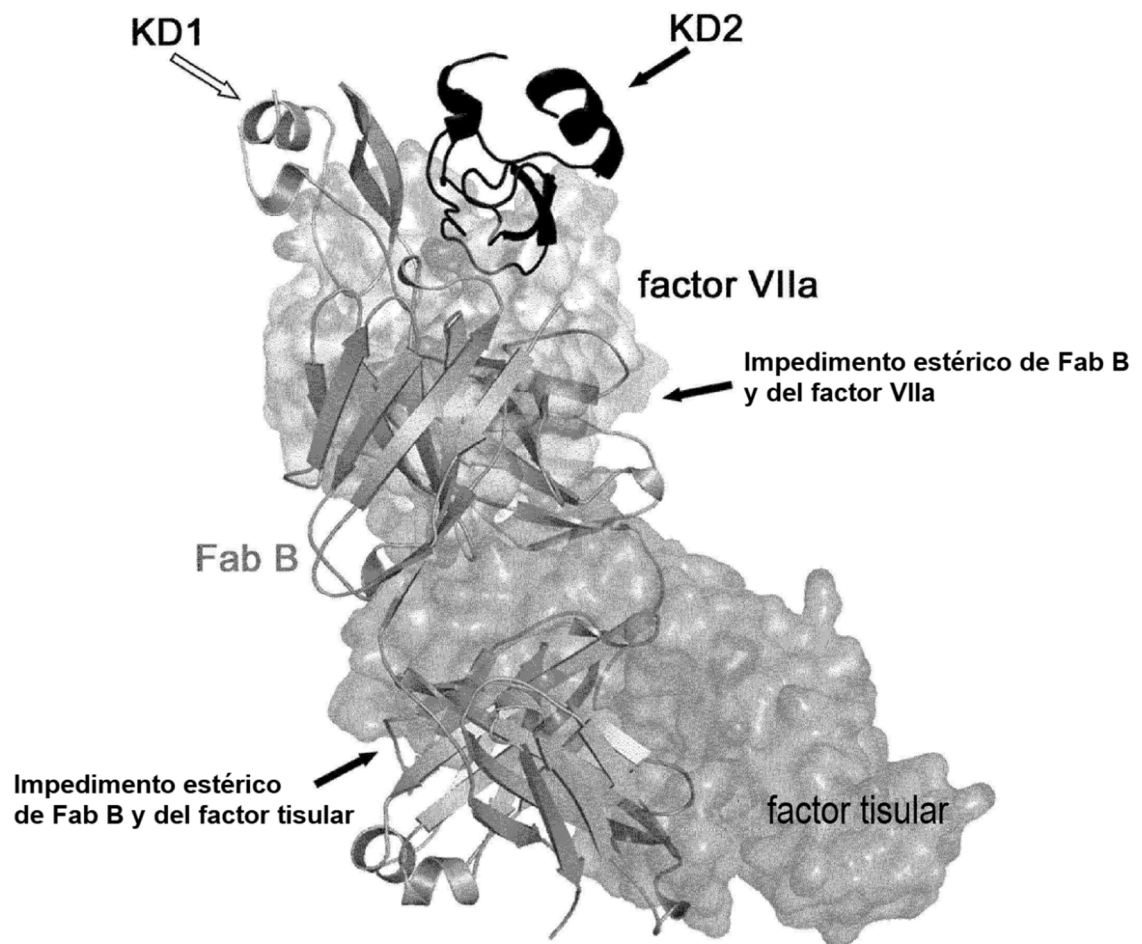


Figura 6

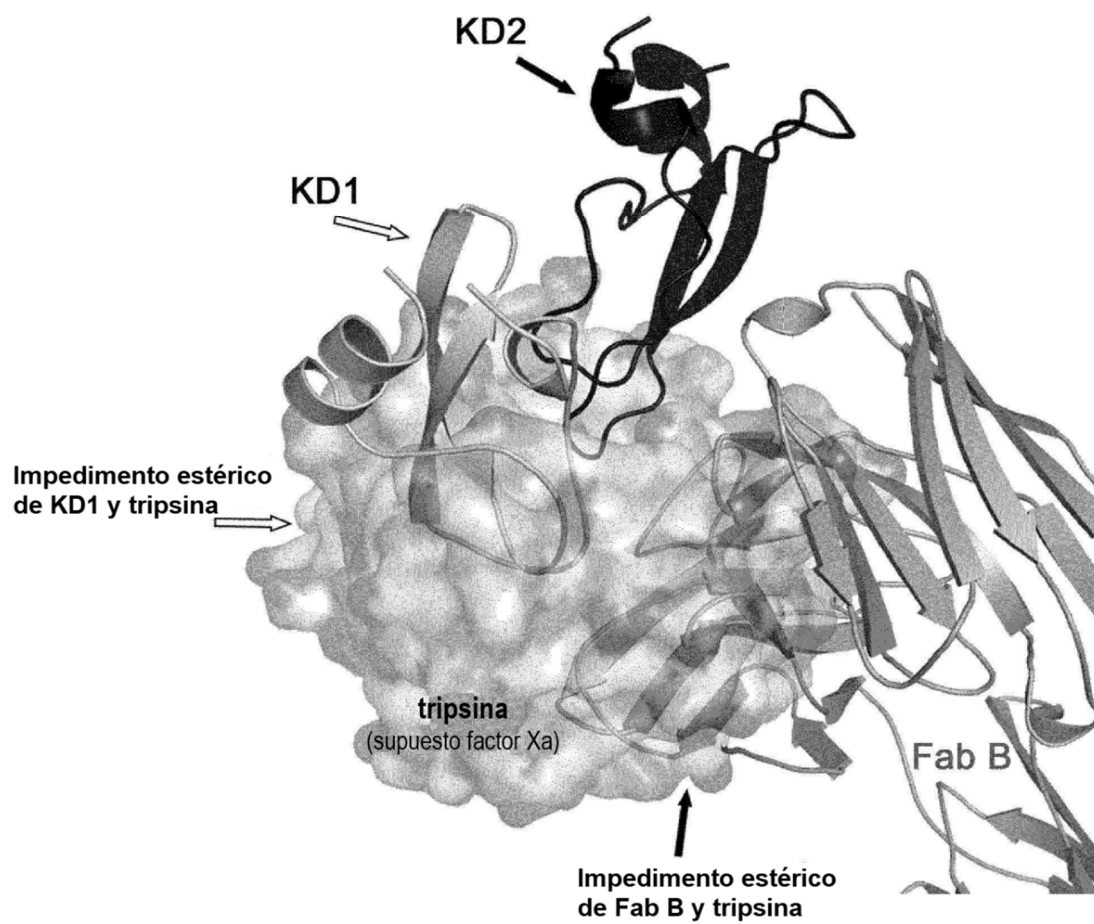


Figura 7

A

Cadena ligera:

```

                **                *
Fab B: 1   DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRNYYAHWYQQKPGQAPVVVIYYDNNRPSGIPER 60
          ELTQPPSVSV+PGQTARI+CSGDNLYYAHWYQQKPGQAPVVVI+YD NRP SGIPER
Fab D: 1   SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDNLPKYYAHWYQQKPGQAPVVVIFYDVNRP SGIPER 60

                **
Fab B: 61   FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSWDDGVFVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120
          FSGSNSGNTATLTISGTQA DEADYYCQ+WPFVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
Fab D: 61   FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWWSSTPVFSGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120

Fab B: 121  SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSL 180
          SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSL
Fab D: 121  SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSL 180

Fab B: 181  TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS 212
          TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Fab D: 181  TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS 212

```

Cadena pesada:

```

          *                *
Fab B: 1   QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYGMSWVRQAPGKGLEWVSSIRRGSSSSSTYY 60
          +V+LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SYGM WVRQAPGKGLEWVSSIRGS STYY
Fab D: 1   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMDWVRQAPGKGLEWVSSIRGSRGSTYY 60

Fab B: 61   ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST 120
          ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST
Fab D: 61   ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGLTVTVSSAST 120

Fab B: 121  KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY 180
          KGPSVFPLAP S+STS TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
Fab D: 121  KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY 180

Fab B: 181  SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC 220
          SLSSVVTVPSS+ GTQTY CNV+HKPSNTKVDK VE K C
Fab D: 181  SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC 220

```

Figura 7

B

