

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 418**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/38 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 17172199 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3345615**

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

30 Prioridad:

01.03.2010 US 309290 P

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

09.06.2020

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard P.O. Box 915
Whippany, NJ 07981-0915, US**

72 Inventor/es:

**SCHOLZ, PETER;
WANG, ZHUOZHI;
PAN, JUNLIANG;
GRUDZINSKA, JOANNA;
VOTSMEIER, CHRISTIAN;
TEBBE, JAN;
BIRKENFELD, JÖRG;
WOBST, NINA;
BRÜCKNER, SIMONE y
STEINIG, SUSANNE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 765 418 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 optimizados contra el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI)

Campo de las realizaciones

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

Antecedentes

La coagulación de la sangre es un proceso en el que la sangre forma coágulos estables para detener la hemorragia. El proceso implica una serie de proenzimas y prococfactores (o "factores de coagulación") circulantes en la sangre. Dichas proenzimas y prococfactores interactúan a través de diversas rutas a través de las cuales se convierten, ya sea secuencial o simultáneamente, a la forma activada. En última instancia, el proceso tiene como resultado la activación de protrombina en trombina a través del Factor X activado (FXa) en presencia del Factor Va, calcio iónico y plaquetas. La trombina activada, a su vez, induce la agregación plaquetaria y convierte fibrinógeno en fibrina, que es reticulado después mediante el Factor XIII activado (FXIIIa) para formar un coágulo.

El proceso que conduce a la activación del Factor X puede tener lugar a través de dos rutas distintas: la ruta de activación por contacto (lo que se conocía anteriormente como la ruta intrínseca) y la ruta del factor tisular (lo que se conocía anteriormente como la ruta extrínseca). Antes se pensaba que la cascada de coagulación consistía en dos rutas de igual importancia unidas en una ruta común. Actualmente, se sabe que la ruta principal para la iniciación de la coagulación de la sangre es la ruta del factor tisular.

El factor tisular (TF) puede activar el Factor X en combinación con el Factor VII activado (FVIIa). El complejo del Factor VIIa y su co-factor esencial, TF, es un potente iniciador de la cascada de coagulación.

El inhibidor de la ruta del factor tisular ("TFPI") controla negativamente la ruta de factor tisular de la coagulación. TFPI es un inhibidor del complejo FVIIa/TF de retroalimentación dependiente de FXa, natural. Es un miembro de los inhibidores de serin-proteasa de tipo Kunitz multivalentes. Fisiológicamente, TFPI se une al Factor X activado (FXa) para formar un complejo heterodimérico, que interactúa posteriormente con el complejo FVIIa/TF para inhibir su actividad, apagando así la ruta de coagulación del factor tisular. En principio, el bloqueo de la actividad de TFPI puede restaurar la actividad de FXa y FVIIa/T-f prolongado así la duración de la acción de la ruta del factor tisular y ampliando la generación de FXa, que es el defecto habitual de la hemofilia A y B.

De hecho, parte de las pruebas experimentales preliminares ha indicado que el bloqueo de la actividad de TFPI mediante anticuerpos contra TFPI normaliza el tiempo de coagulación prolongado y acorta el tiempo de hemorragia. Por ejemplo, Nordfang y col. demostraron que se normalizaba el tiempo de protrombina diluido prolongado del plasma hemofílico tras el tratamiento del plasma con anticuerpos para TFPI (Thromb. Haemost., 1991, 66(4): 464-467). De manera similar, Erhardtsen y col. demostraron que el tiempo de hemorragia en un modelo de conejo con hemofilia A se acortaba significativamente mediante anticuerpos anti-TFPI (Blood Coagulation y Fibrinolysis, 1995, 6: 388-394). Estos estudios señalan que la inhibición de TFPI mediante anticuerpos anti-TFPI puede ser útil para el tratamiento de hemofilia A o B. En estos estudios se empleó únicamente anticuerpo anti-TFPI policlonal.

Mediante el uso de técnicas del hibridoma, se prepararon e identificaron anticuerpos monoclonales contra TFPI humano recombinante (rhTFPI). Véase Yang y col., Chin. Med. J., 1998, 111(8): 718-721. Se sometió a ensayo el efecto del anticuerpo monoclonal sobre el tiempo de protrombina diluido (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT). Los experimentos demostraron que el anticuerpo monoclonal anti-TFPI acortaba el tiempo de coagulación de tromboplastina diluido de plasma con deficiencia en Factor IX. Esto señala que la ruta del factor tisular desempeña un importante papel no solamente 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).

Por consiguiente, los anticuerpos específicos para TFPI son necesarios para tratar enfermedades hematológicas y cáncer.

Generalmente, se han generado anticuerpos terapéuticos para enfermedades humanas por ingeniería genética para crear anticuerpos totalmente humanos o humanizados, quiméricos, murinos. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales murinos tienen un uso limitado como agentes terapéuticos dada su corta semi-vida en suero, la incapacidad para desencadenar funciones efectoras humanas y la producción de anticuerpos anti-ratón humanos (Brekke y Sandlie, "Therapeutic Antibodies for Human Diseases at the Dawn of the Twenty-first Century," Nature 2, 53, 52-62, Jan. 2003). Se ha demostrado que los anticuerpos quiméricos dan lugar a respuestas de anticuerpo anti-quimérico humano. Los anticuerpos humanizados minimizan además el componente ratón de los anticuerpos. Sin embargo, un anticuerpo completamente humano evita la inmunogenicidad asociada con elementos murinos completamente. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos completamente humanos para evitar la inmunogenicidad asociada con otras formas de anticuerpos monoclonales obtenidos por ingeniería genética. En particular, el tratamiento profiláctico crónico, como el que sería necesario para tratar la hemofilia, con un anticuerpo monoclonal anti-TFPI presenta un alto riesgo de desarrollar una respuesta inmune a la terapia si se utiliza un

anticuerpo con un componente murino o de origen murino debido a la frecuente dosificación requerida y la larga duración de la terapia. Por ejemplo, la terapia de anticuerpo para hemofilia A puede requerir una dosificación semanal de por vida para un paciente. Esto supondría un desafío continuo para el sistema inmune. Por lo tanto, existe la necesidad de contar con un anticuerpo completamente humano para terapia de anticuerpo contra la hemofilia y las deficiencias o los defectos genéticos y adquiridos en la coagulación.

Se han fabricado anticuerpos terapéuticos por 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 se pueden fabricar anticuerpos completamente humanos por recombinación en procariotas y eucariotas. Para un anticuerpo terapéutico es preferente la producción recombinante de un anticuerpo en una célula huésped en lugar de la producción del hibridoma. La producción recombinante supone las ventajas de una mayor consistencia de producto, un nivel de producción probablemente más alto y una fabricación controlada que reduce al mínimo o elimina la presencia de proteínas de origen animal. Por estas razones es deseable contar con un anticuerpo anti-TFPI monoclonal producido por recombinación.

Asimismo, dado que TFPI se une a Factor X activado (FXa) con una alta afinidad, un anticuerpo anti-TFPI eficaz debería tener una afinidad comparable. Por tanto, es deseable contar con un anticuerpo anti-TFPI que tenga una alta afinidad de unión que pueda competir con la unión de TFPI/FXa. Los anticuerpos de la presente invención tienen propiedades mejoradas en comparación con los desvelados en el documento WO 2010/017196 A2. Particularmente se mejora la afinidad. Por lo tanto, los anticuerpos con las cadenas pesada y ligera según la invención descrita en el presente documento son variantes mejoradas con respecto a las del documento WO 2010/017196 A2.

Sumario

Se proporcionan anticuerpos monoclonales para el inhibidor de la ruta del factor tisular humano (TFPI). Se proporcionan asimismo moléculas de ácido nucleico aisladas que los codifican. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti-TFPI y procedimientos de tratamiento de deficiencias o defectos genéticos o adquiridos de la coagulación, tales como hemofilia A y B. Se proporcionan asimismo procedimientos para acortar el tiempo de hemorragia administrando un anticuerpo monoclonal anti-TFPI a un paciente que lo necesita. Se proporcionan también procedimientos para producir un anticuerpo monoclonal que se une a TFPI humano de acuerdo con la presente invención.

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales para TFPI proporcionados han sido optimizados por ejemplo para que tengan una mayor afinidad o una mayor actividad funcional.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un gráfico de barras en el que se ilustran variantes 2A8 seleccionadas con sustituciones de aminoácido simples que fueron más potentes para acortar el tiempo de coagulación en plasma de hemofilia A humano aplicando un ensayo dPT.

La Figura 2 representa un gráfico en el que se muestra el efecto de anticuerpos anti-TFPI mutados con un solo aminoácido seleccionado en el tiempo de coagulación de sangre hemofílica humana inducida con anticuerpo anti-factor VIII.

La Figura 3 representa un gráfico en el que se muestra que 4B7-D62R tiene mucha más potencia para acortar el tiempo de coagulación en sangre con hemofilia A inducida con anticuerpo humano en comparación con el anticuerpo 4B7 parental y en un menor grado, en comparación con sustituciones de un solo aminoácido dentro de 2A8.

La Figura 4 representa dos gráficos en los que se muestra la supervivencia de ratones con hemofilia A tratados con el anticuerpo 2A8 parental y la variante de 2A8 que tiene sustituciones de múltiples aminoácidos (A200) dependiendo de la dosis en comparación con el ratón IgG1 de control (CTX IgG1).

La Figura 5 representa un gráfico en el que se demuestra que una variante 2A8 potenció la coagulación en plasma con hemofilia C humano (deficiente en FXI) dependiendo de la dosis y sus efectos fueron comparables con los de FVIIa recombinante.

Descripción detallada

Definiciones

La expresión "inhibidor de la ruta del factor tisular" o "TFPI", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier variante, isoforma y especie homóloga de TFPI humano expresado de forma natural por las células. En una realización preferente de la invención, la unión de un anticuerpo de la invención a TFPI reduce el tiempo de coagulación de la sangre.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo entero o cualquier

fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadena simple del mismo. El término incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (p.ej., un anticuerpo IgG) de origen natural o formado por procesos de recombinación del fragmento del gen de inmunoglobulina normal o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, como por ejemplo un fragmento de anticuerpo, que retiene la actividad de unión específica. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por un 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 ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión que abarca la expresión "porción 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 que 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 complementariedad aislada (CDR); (vii) minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos κ (véase, p.ej. 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 por separado, se pueden unir aplicando procedimientos recombinantes mediante un engarce sintético que da cabida a su fabricación como una cadena de proteína simple en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena simple Fv (scFv); Véase p.ej., Bird y col. (1988) Science 242:423-426; y Huston y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 85:5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos de cadena simple queden abarcados también dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Dichos fragmentos de anticuerpo se obtienen aplicando técnicas convencionales conocidas entre las personas especializadas en la técnica y los fragmentos se analizan en cuanto a su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Además, se contempla la posibilidad de que un mimético de anticuerpo quede abarcado en el fragmento de unión a antígeno. La expresión "mimético de anticuerpo" o el término "mimético", tal como se utilizan en el presente documento significan una proteína que presenta una unión similar a un anticuerpo, pero que es un anticuerpo alternativo más pequeño o una proteína que no es anticuerpo. Dichos miméticos de anticuerpo pueden estar comprendidos en un armazón. El término "armazón" se refiere a una plataforma de polipéptido para la obtención por ingeniería genética de nuevos productos con funciones y características adaptadas.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "inhibe la unión " y "bloquea la unión " (p.ej., al referirse a la inhibición/bloqueo de la unión de un ligando TFPI a TFPI) se utilizan indistintamente y abarcan la inhibición o bloqueo tanto parcial como completa. Se pretende asimismo que inhibición y bloqueo incluyan cualquier descenso medible en la afinidad de unión de TFPI en un sustrato fisiológico cuando entra en contacto con un anticuerpo anti-TFPI en comparación con TFPI que no entra en contacto con un anticuerpo anti-TFPI, p.ej., el bloqueo de la interacción de TFPI con el factor Xa o el bloqueo de la interacción de un complejo TFPI-factor Xa con 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 como se utilizan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal despliega una sola especificidad de unión y afinidad para un epítipo en particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que despliegan una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p.ej. mutaciones incluidas aleatoriamente o mutagénesis específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

Se pretende que "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente desprovisto de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades de antígeno (p.ej. un anticuerpo aislado que se une a un TFPI está sustancialmente desprovisto de anticuerpos que se unen a antígenos distintos a 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, p.ej. de otras especies (p.ej. homólogos de especies TFPI). Es más, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente desprovisto de otro material celular y/o sustancias químicas.

Tal como se utiliza en el presente documento, "unión específica" se refiere a la unión de anticuerpo a un antígeno determinado previamente. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente $10^5 M^{-1}$ y se une con el antígeno predeterminado con una afinidad que es superior, por ejemplo al menos el doble, que su afinidad para la unión con un antígeno irrelevante (p.ej., BSA, caseína) distinto al antígeno determinado previamente o un antígeno íntimamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce 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"

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente $10^7 M^{-1}$, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente

10⁸M⁻¹, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 10⁹M⁻¹, 10¹⁰M⁻¹, 10¹¹M⁻¹ o más, p.ej., hasta 10¹³M⁻¹ o más. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos del anticuerpo. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente 1,0 x 10⁷M⁻¹. Tal como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (p.ej., IgM o IgG1) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada.

"Región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a una de las tres regiones hipervariables dentro de la región variable de una cadena pesada o la región variable de la cadena ligera de una molécula de anticuerpo que forman una superficie de unión a antígeno N-terminal que es complementaria para la estructura tridimensional del antígeno unido. Procedentes del término N de una cadena pesada o ligera, estas regiones determinantes de complementariedad se representan "CDR1," "CDR2," y "CDR3," respectivamente. Las CDR participan en la unión antígeno-anticuerpo y la CDR3 comprende una región única específica para la unión antígeno-anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno, por tanto, puede incluir seis CDR, que comprenden las regiones CDR desde cada región V pesada y ligera

Tal como se utiliza en el presente documento, "sustituciones conservadoras" se refiere a modificaciones de un polipéptido que implican la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares que no tienen como resultado ninguna pérdida de la función biológica o bioquímica del polipéptido. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es aquella en la que el resto 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. Dichas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p.ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p.ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Se prevé que los anticuerpos de la presente invención puedan tener sustituciones de aminoácido conservadoras y retengan todavía su actividad.

En cuanto a los ácidos nucleicos y polipéptidos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan óptimamente, son idénticos, con las inserciones o deleciones de nucleótidos o aminoácidos apropiadas, en al menos aproximadamente 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. Alternativamente, existe una homología sustancial para los ácidos nucleicos cuando los segmentos se hibriden en condiciones de hibridación selectivas para el complemento de la cadena. La invención incluye secuencias de ácido nucleico y secuencias de polipéptido que tienen una sustancial homología con las secuencias de ácido nucleico específicas y las secuencias de aminoácido que se citan en el presente documento.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de porciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n° de posiciones idénticas / total de n° de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que hay que introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se puede realizar aplicando un algoritmo matemático, como por ejemplo, pero sin limitación, el módulo AlignX™ de VectorNTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Para AlignX™, los parámetros por defecto de alineamiento múltiple son: penalización de apertura de hueco: 10; penalización de extensión de hueco: 0,05; intervalo de penalización de separación de hueco: 8; % de identidad por retardo en la alineación: 40. (para más detalles consultar <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-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 el mejor emparejamiento global entre una secuencia buscada (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominada alineamiento de secuencia global, se puede determinar 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 un alineamiento de secuencia, la secuencia buscada y la secuencia objeto son ambas secuencias de ADN. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en un alineamiento CLUSTALW de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad a través de alineamientos de pares son: Matriz = IUB, k-tupla = 1, Número de diagonales superiores = 5, Penalización de hueco = 3, Penalización de apertura de hueco = 10, Penalización de extensión de hueco = 0,1. Para alineamientos múltiples, son preferentes los siguientes parámetros CLUSTALW: Penalización de apertura de hueco = 10, Parámetro de extensión de hueco = 0,05; Intervalo de penalización de separación de hueco = 8; % de identidad para alineamiento = 40.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en forma parcialmente pura o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "queda sustancialmente puro" cuando se ha purificado eliminado todos los demás componentes celulares con los que está asociado normalmente en el entorno natural.

Para aislar un ácido nucleico, se pueden utilizar las técnicas convencionales, como puedan ser las citadas a continuación: tratamiento alcalino/SDS, bandas CsCl, cromatografía de columna, electroforesis sobre gel de agarosa y otros conocidos dentro de la técnica.

Anticuerpos monoclonales optimizados para alta afinidad y actividad funcional

5 En un estudio anterior se identificaron varios anticuerpos anti-TFPI y se describieron en la solicitud PCT N.º PCT/US2009/052702 presentada el 4 de agosto de 2009, incorporada en el presente documento como referencia para todos los fines. Dichos anticuerpos anti-TFPI se pueden optimizar además, por ejemplo, mejorando su afinidad y actividad de bloqueo para TFPI. Dicha optimización se puede realizar por ejemplo aplicando mutagénesis por saturación de sitio de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) o restos en íntima proximidad con las CDR, es decir aproximadamente 3 o 4 restos adyacentes a las CDR, de los anticuerpos.

Se proporcionan también anticuerpos monoclonales que tienen una mayor afinidad o una alta afinidad para TFPI. En algunas realizaciones los anticuerpos anti-TFPI tienen una afinidad de unión de al menos aproximadamente 10^7M^{-1} , en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 10^8M^{-1} , en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 10^9M^{-1} , 10^{10}M^{-1} , 10^{11}M^{-1} o más, p.ej., hasta 10^{13}M^{-1} o más.

15 Se utilizó mutagénesis por saturación de sitio en las CDR o adyacente a ellas de dos anticuerpos parentales anti-TFPI, designados en el presente documento 2A8 y 4B7, para optimizar los anticuerpos en cuanto a la afinidad y la actividad funcional. Se contempla asimismo que se pueda llevar a cabo la misma optimización en cualquiera de los anticuerpos descritos en la anterior PCT/US2009/052702.

20 En algunas realizaciones, la mutagénesis por saturación de sitio de las CDR se puede realizar en los anticuerpos anti-TFPI. Para 2A8, las CDR en la cadena pesada presentada en SEQ ID NO: 1 corresponde a los restos FTFRSYGMS (restos 27 a 35), SIRGSSSSTYYADSVKG (restos 50 a 66) y KYRYWFDY (restos 99 a 106). Para 2A8 la cadena ligera presentada en SEQ ID NO: 2, las CDR corresponden a los restos SGDNLRNYYAH (restos 23 a 33), YYDNNRPS (restos 48 a 55) y QSWDDGVPV (restos 88 a 96). Para 4B7, las CDR en la cadena pesada presentada en SEQ ID NO: 3 corresponden a los restos DSVSSNSAAWS (restos 27 a 37), ILYKRSKWYNDYAVSVKS (restos 52 a 70) y WHSDKHWGFDY (restos 102 a 112). Para 4B7, la cadena ligera presentada en SEQ ID NO: 4, las CDR corresponden a los restos RSSQSLVFS DGNTYLN (restos 24 a 39), KGSNRAS (restos 55 a 61) y QQYDSYPLT (restos 94 a 102) de SEQ ID NO: 4. Se puede introducir una modificación en cualquiera de las seis CDR individualmente o se pueden introducir combinaciones de modificaciones. Asimismo, se pueden introducir dos o más modificaciones en una sola CDR. En otras realizaciones, se pueden introducir también modificaciones en íntima proximidad a las CDR, por ejemplo aproximadamente 3 o 4 restos a cada lado de cada CDR.

35 Brevemente, se introdujeron modificaciones de aminoácido simples y/o múltiples para optimizar, p.ej. mejorar la afinidad y se analizaron de los anticuerpos parentales 2A8 y 4B7. En primer lugar, se introdujeron modificaciones de aminoácido en las seis CDR o adyacentes a las CDR de cada anticuerpo seguido de análisis de las propiedades de unión a TFPI. Se seleccionaron las modificaciones que aumentaron la señal de unión a TFPI para combinarlas con una o más modificaciones más y se analizaron en cuanto a un mayor aumento de la señal de unión. Después de cada análisis, se utilizaron las variantes de anticuerpo seleccionadas para medir su afinidad a TFPI y la actividad de bloqueo de la actividad de TFPI y el acortamiento del tiempo de coagulación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano que tiene una mayor afinidad para TFPI en comparación con los anticuerpos parentales sin modificar. Asimismo, en algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano que tiene una mayor actividad de bloqueo de TFPI en comparación con los anticuerpos parentales sin modificar. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor humano de la ruta del factor tisular humano que tiene un tiempo de coagulación acortado en comparación con los anticuerpos parentales sin modificar.

45 En algunas realizaciones, se introdujeron modificaciones de aminoácido adicionales para reducir la divergencia desde la secuencia de línea germinal. En otras realizaciones, se introdujeron modificaciones de aminoácido para facilitar la producción de anticuerpo para procedimientos de producción a gran escala.

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

El anticuerpo puede ser cualquiera de las distintas clases de anticuerpos, como por ejemplo, sin limitación, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgA secretor, IgD e IgE.

En una realización, se proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado para un inhibidor de la ruta del factor tisular.

55 En otra realización, se proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado para dominio 2 de Kunitz de inhibidor de la ruta del factor tisular humano.

Variantes 2A8

Por consiguiente, en el presente documento, se describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos comprende una o más modificaciones de aminoácidos. En algunas realizaciones la modificación de la cadena pesada de 2A8 es una sustitución, una inserción o una delección.

En algunas realizaciones, las sustituciones están localizadas en las CDR de la cadena pesada de 2A8. En otras realizaciones, las sustituciones están localizadas fuera de las CDR de la cadena pesada de 2A8

En algunas realizaciones o variantes descritas, la sustitución de la cadena pesada de 2A8 está en una posición seleccionada entre S31, G33, S35, I51, S54, S55, K99 y F104. En algunas realizaciones o variantes descritas, la sustitución de la cadena pesada de 2A8 puede incluir también una posición seleccionada entre Q1, R30, M34, S50, R52 y S56. Por ejemplo, la sustitución se puede seleccionar entre Q1E, R30S, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I, M34K, S35L, S35D, S50A, I51D, I51E, R52S, S54F, S54D, S55A, S55G, S55R, S56G, K99V, K99L y F104Y. Asimismo, en algunas realizaciones o variantes descritas, el anticuerpo puede comprender dos o más sustituciones seleccionadas entre Q1E, R30S, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I, M34K, S35L, S35D, S50A, I51D, I51E, R52S, S54F, S54D, S55A, S55G, S55R, S56G, K99V, K99L y F104Y.

En algunas variantes descritas, la cadena pesada de 2A8 tiene las siguientes sustituciones en relación con SEQ ID NO :1: S31V+I51D+S54F+K99V; G33P+S35D+S54F+K99L; S35D+I51D+S55R+K99V; S35L+S54F+K99V; S31V+G33P+S35D; S35D+I51D+K99L; S31V+I51D+S55R+K99L; S31V+S35D+I51D+K99V; G33P+I51D+S54F; I51D+S54F+K99L; S35D+K99L; S31V+G33P+I51D+S54F+K99V; S35D+I51E+S55R+K99L; S31V+K99V; S31V+I51E+S55R+K99V; S35D+S55R+K99L; S31V+S54F+K99L; S31V+I51D+S55R+K99V; S31V+S35D+S55R; S31V+S35D; S31V+I51D+S55R; S35D+S54F+S55R+K99L; S31V+S35D+S54F S31V+S35L+I51D+S54F+K99V; y S31V+S35L+I51E+S54F+K99V.

En algunas variantes descritas, la cadena pesada de 2A8 tiene las siguientes sustituciones en relación con SEQ ID NO: 1: G33A+S35D+S55R+K99L; G33P+I51D+S54F; G33P+S35D+S54F+K99L; I51D+S54F+K99L; M34I+S35D+S55R+K99L; M34K+S35D+S55R+K99L; Q1E+R30S+S35D+S55G+S56G+K99L; Q1E+R30S+S35D+S55R+S56G+K99L; Q1E+S31V +S50A+I51D+S55R+S56G+K99V; Q1E+S35D+S55R+K99L; R30S+S31V+I51D+S55R+K99V; R30S+S35D+S55R+K99L; S31V+G33A+I51D+S55R+K99V; S31V+G33P+I51D+S54F+K99V; S31V+G33P+S35D; S31V+I51D+R52S+S55R+K99V; S31V+I51D+S54F+K99V; S31V+I51D+S55R; S31V+I51D+S55R+K99L; S31V+I51D+S55R+K99V; S31V+I51D+S55R+S56G+K99V; S31V+I51E+S55R+K99V; S31V+K99V; S31V+S35D; S31V+S35D+I51D+K99V; S31V+S35D+S54F; S31V+S35D+S55R; S31V+S35L+I51D+S54F+K99V; S31V+S35L+I51E+S54F+K99V; S31V+S50A+I51D+S55R+K99V; S31V+S54F+K99L; S35D+I51D+K99L; S35D+I51D+S55R+K99V; S35D+I51E+S55R+K99L; S35D+K99L; S35D+R52S+K99L; S35D+R52S+S55R+K99L; S35D+S50A+K99L; S35D+S50A+S55R+K99L; S35D+S54F+S55R+K99L; S35D+S55G+K99L; S35D+S55R+K99L; S35D+S55R+S56G+K99L; S35D+S56G+K99L; y S35L+S54F+K99V.

En algunas realizaciones, la cadena pesada de 2A8 tiene una o más delecciones. En algunas variantes, las delecciones están localizadas en las CDR de la cadena pesada de 2A8. En otras realizaciones, las delecciones están localizadas fuera de las CDR de la cadena pesada de 2A8. En algunas realizaciones o variantes descritas, por ejemplo, la delección está en una posición seleccionada entre I51, S56 y S57.

En el presente documento se describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia de aminoácidos comprende una o más modificaciones de aminoácido.

En algunas realizaciones, la modificación es una sustitución, una inserción o una delección.

En algunas realizaciones las sustituciones están localizadas en las CDR de la cadena ligera de 2A8. En otras realizaciones las sustituciones están localizadas fuera de las CDR de la cadena ligera de 2A8.

En algunas realizaciones o en variantes descritas, la sustitución de la cadena ligera de 2A8 está en una posición seleccionada entre A32, Y48, N51, N52, P54, D91, D92 y V96. En algunas realizaciones o variantes, la sustitución de la cadena ligera de 2A8 puede incluir también una posición seleccionada entre D1, I2, A13, S21, N26, R28, N29, H33, Y49, G56, E80, S89, G93, V94 y P95. Por ejemplo, la sustitución se puede seleccionar entre D1S, I2Y, A13S, S21T, N26A, R28P, N29K, A32N, H33Y, Y48F, Y49R, N51S, N51V, N52G, P54L, G56D, E80M, S89A, D91L, D91R, D91W, D91K, D92S, D92T, G93S, V94T, P95V, P95A, V96G, V96M y V96W. Asimismo, en algunas realizaciones o en variante descritas, el anticuerpo puede comprender dos o más sustituciones seleccionadas entre D1S, I2Y, A13S, S21T, N26A, R28P, N29K, A32N, H33Y, Y48F, Y49R, N51S, N51V, N52G, P54L, G56D, E80M, S89A, D91L, D91R, D91W, D91K, D92S, D92T, G93S, V94T, P95V, P95A, V96G, V96M y V96W.

En algunas variantes descritas, la cadena ligera de 2A8 tiene las siguientes sustituciones en relación con la SEQ ID

NO: 2: Y48F+N51V; Y48F+N52G; Y48F+D91K; Y48F+D91L+V96W; Y48F+D91W; Y48F+N52G+D91L+V96W; Y48F+N51V+V96W; D91L+V96W; Y48F+N51V+D91W; Y48F+N51V+D91L+V96W; N51V+D91W; Y48F+N51V+G56D+V96W; Y48F+N51V+D91L; y N51V+D91K.

En algunas variantes descritas, la cadena ligera de 2A8 tiene las siguientes sustituciones en relación con SEQ ID

- 5 NO:2: A13S+Y48F+N51V+D91W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+D91W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V 94T; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+Y49R+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V9 6W;
- 10 D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+D91W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T; D1S+Y48F+N51V+D91W; D91L+V96W; H33Y+Y48F+N51V+D91W; I2Y+Y48F+N51V+D91W; N26A+Y48F+N51V+D91W; N29K+Y48F+N51V+D91W; N51V+D91K; N51V+D91W; R28P+Y48F+N51V+D91W; S21T+Y48F+N51V+D91W; Y48F+D91K; Y48F+D91L+D92S+V96W; Y48F+D91L+G93S+V96W; Y48F+D91L+P95V+V96W;
- 15 Y48F+D91L+V94T+V96W; Y48F+D91L+V96W; Y48F+D91W; Y48F+N51S+D91L+V96W; Y48F+N51V; Y48F+N51V+D91L; Y48F+N51V+D91L+V96W; Y48F+N51V+D91W; Y48F+N51V+D91W+D92S; Y48F+N51V+D91W+G93S; Y48F+N51V+D91W+P95V; Y48F+N51V+D91W+V94T; Y48F+N51V+E80M+D91W; Y48F+N51V+G56D+V96W; Y48F+N51V+S89A+D91W; Y48F+N51V+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T+P95A; Y48F+N51V+V96W; Y48F+N52G; Y48F+N52G+D91L+V96W; y Y48F+S89A+D91L+V96W.

- 20 En el presente documento también se describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido.. Anteriormente, se han dado ejemplos de modificaciones que se pueden incorporar.
- 25

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

- 30 En algunas realizaciones el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ

- 35 ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 5; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 12. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 6; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 13. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 7; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 14. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 8; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 15. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 9; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 10; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 11; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 18.
- 55

Variantes 4B7

Se describe también en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos presentada en

60

SEQ ID NO: 3 que comprende una o más modificaciones de aminoácido. En algunas variantes descritas, la modificación de la cadena pesada de 4B7 es una sustitución, una inserción o una delección.

En algunas variantes descritas, las sustituciones están localizadas en las CDR de la cadena pesada de 4B7. En otras variantes, las sustituciones están localizadas fuera de las CDR de la cadena pesada de 4B7.

- 5 En algunas variantes descritas, la sustitución de la cadena pesada de 4B7 está en una posición seleccionada entre S30, N32, S57, K58, N61, D62, H103, H107, G109 y Y112. En algunas variantes descritas, la sustitución de la cadena pesada de 4B7 puede incluir también una posición seleccionada entre Q1, S37, G44, I53 y K55. Por ejemplo, la sustitución se puede seleccionar entre Q1E, S30R, N32D, N32E, S33G, S37N, G44S, I53T, K55Y, S57K, S57R, K58M, N61G, N61T, D62I, D62R, D62Q, D62L, D62S, D62V, D62N, D62K, H103D, H103G, H107M, G109A y Y112D. Asimismo, en algunas variantes, el anticuerpo puede comprender dos o más sustituciones seleccionadas entre Q1E, S30R, N32D, N32E, S33G, S37N, G44S, I53T, K55Y, S57K, S57R, K58M, N61G, N61T, D62I, D62R, D62Q, D62L, D62S, D62V, D62N, D62K, H103D, H103G, H107M, G109A y Y112D.

En algunas variantes descritas, la cadena pesada de 4B7 tiene las siguientes sustituciones en relación con SEQ ID NO: 3:

- 15 N32D+D62Q+H107M+Y112D; N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D; N32D+D62R+H107M+Y112D; N32D+D62R+Y112D; D62Q+Y112D; D62R+Y112D; D62R+H107M+Y112D; N32D+D62Q+Y112D; N32D+D62R+H107M; N32D+D62S+H107M+Y112D; D62Q+H107M+Y112D; N32D+D62R+H103D; D62S+H107M+Y112D; S30R+S57K; N61G+D62V; y K58M+D62N. En algunas variantes descritas, la cadena pesada de 4B7 tiene las siguientes sustituciones en relación con SEQ ID NO: 3: D62Q+H107M+Y112D; D62Q+Y112D; D62R+H107M+Y112D; D62R+Y112D; D62S+H107M+Y112D; N32D+D62K+Y112D; N32D+D62Q+H107M+Y112D; N32D+D62Q+Y112D; N32D+D62R+H103D; N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D; N32D+D62R+H107M; N32D+D62R+H107M+Y112D; N32D+D62R+Y112D; N32D+D62S+H107M+Y112D; N32D+G44S+D62R+Y112D; N32D+I53T+D62Q+Y112D; N32D+I53T+D62R+Y112D; N32D+K55Y+D62Q+Y112D; N32D+K55Y+D62R+Y112D; N32D+S37N+D62R+Y112D; Q1E+N32D+D62R+Y112D; Q1E+N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D; N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D; S30R+S57K; N61G+D62V; y K58M+D62N.

- Se describe asimismo un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 4 que comprende una o más modificaciones de aminoácido. En algunas variantes descritas la modificación de la cadena ligera de 4B7 se selecciona entre una sustitución, una inserción o una delección.

En algunas variantes descritas, las sustituciones están localizadas en las CDR de la cadena ligera de 4B7. En otras variantes descritas, las sustituciones están localizadas fuera de las CDR de la cadena ligera de 4B7.

- En algunas variantes descritas, la sustitución de la cadena ligera de 4B7 está en una posición seleccionada entre F31, S32, D33, N35, Y37, Y54, G56, S57, S61 y D97. En algunas variantes descritas, la sustitución de la cadena ligera de 4B7 puede incluir también una posición seleccionada entre M4, V30, T36, N39, L42, K44, Q50, L51, K55, A60 y S98. Por ejemplo, la sustitución se puede seleccionar entre M4I, M4L, V30L, F31I, F31M, F31Y, F31H, S32L, S32R, S32Y, D33F, D33R, N35I, N35L, N35T, N35V, T36N, Y37F, N39D, L42Q, K44R, Q50R, L51R, Y54F, K55L, G56D, G56A, G56V, S57Y, A60D, S61C, D97M, D97T y S98H. Asimismo, en algunas variantes descritas, el anticuerpo puede comprender dos o más sustituciones seleccionadas entre M4I, M4L, V30L, F31I, F31M, F31Y, S32L, S32R, S32Y, D33F, D33R, N35I, N35L, N35T, N35V, T36N, Y37F, N39D, L42Q, K44R, Q50R, Y54F, K55L, G56D, G56A, G56V, S57Y, A60D, S61C, D97M, D97T y S98H.

- En algunas variantes descritas, la cadena ligera de 4B7 tiene las siguientes sustituciones en relación con SEQ ID NO: 4: S32R+N35T; S32R+N35T+D97T; S32R+D33F+N35I; S32R+D33F+N35I+D97T; S32R+D33F+N35T; S32R+D33F; S32R+D33R+N35I; S32R+D33R+N35I+D97T; S32R+D33R; S32R+D33R+N35T; N35T+D97T; D33F+N35I; D33F+N35I+D97T; D33F+N35T+Y37F; D33R+N35I; D33R+N35I+D97T; D33R+N35T; F31I+S32R+N35I+D97T; F31I+S32R+D33F+N35I+D97T; F31I+S32R+D33F+N35T; F31I+S32R+D33R+N35I+D97T; F31I+N35I; F31I+D33F+N35I; F31I+D33F+N35I+D97T; F31I+D33R+N35I; F31I+D33R; F31M+S32L+D33R+N35I+D97T; F31M+S32R+D33F+N35I; F31M+S32R+D33F+N35I+D97T; F31M+S32R+D33F+D97T; F31M+S32R+D33R+N35I; F31M+S32R+D33R+N35I+D97T; F31M+S32R+D33R; F31M+S32R+D33R+N35T; F31M+D33F+N35I; F31M+D33F; F31M+D33F+N35T; F31M+D33R+N35I; F31M+D33R; S32R+N35I; F31M+D33F+N35T+Y37F; N35V+G56D; N35L+G56A; y D33F+Y54F.

- En algunas variantes descritas, la cadena ligera de 4B7 tiene las siguientes sustituciones en relación con SEQ ID NO: 4: D33F+N35I; D33F+N35I+D97T; D33F+N35T+Y37F; D33R+N35I; D33R+N35I+D97T; D33R+N35T; F31H+S32R+D33F+N35I+D97T; F31I+D33F+N35I; F31I+D33F+N35I+D97T; F31I+D33F+N35I+K44R; F31I+D33F+N35I+L42Q; F31I+D33F+N35I+S98H; F31I+D33F+N35I+T36N; F31I+D33R; F31I+D33R+N35I; F31I+N35I; F31I+S32R+D33F+N35I+D97T; F31I+S32R+D33F+N35T; F31I+S32R+D33R+N35I+D97T; F31I+S32R+N35I+D97T; F31M+D33F; F31M+D33F+N35I; F31M+D33F+N35T; F31M+D33F+N35T+Y37F; F31M+D33R; F31M+D33R+N35I; F31M+S32L+D33R+N35I+D97T; F31M+S32R+D33F+D97T;

5 F31M+S32R+D33F+N35I; F31M+S32R+D33F+N35I+D97T; F31M+S32R+D33R; F31M+S32R+D33R+N35I;
F31M+S32R+D33R+N35I+D97T; F31M+S32R+D33R+N35T; F31Y+S32R+D33F+N35I+D97T;
M4I+S32R+D33F+N35I+D97T; M4L+S32R+D33F+N35I+D97T; N35T+D97T; S32R+D33F; S32R+D33F+N35I;
S32R+D33F+N35I+A60D+D97T; S32R+D33F+N35I+D97T; S32R+D33F+N35I+D97T+S98H;
S32R+D33F+N35I+G56V+D97T; S32R+D33F+N35I+K44R+D97T; S32R+D33F+N35I+K55L+D97T;
S32R+D33F+N35I+L42Q+D97T; S32R+D33F+N35I+L51R+D97T; S32R+D33F+N35I+N39D+D97T;
S32R+D33F+N35I+Q50R+D97T; S32R+D33F+N35I+T36N+D97T; S32R+D33F+N35T; S32R+D33R;
S32R+D33R+N35I; S32R+D33R+N35I+D97T; S32R+D33R+N35T; S32R+N35I; S32R+N35T; S32R+N35T+D97T;
V30L+F31I+D33F+N35I; V30L+S32R+D33F+N35I+D97T; V30L+S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;
10 V30L+S32R+N35I+T36N; N35V+G56D; N35L+G56A; y D33F+Y54F.

También se describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que dicho anticuerpo comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO:3, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO:4, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Anteriormente, se han dado ejemplos de las modificaciones que se pueden introducir.

En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.

20 En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34.

En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 19; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 27. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 20; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 28. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 21; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 29. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 22; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 30. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 23; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 31. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 24; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 32. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 25; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 33. En algunas variantes descritas, el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 26; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 34.

Combinaciones de variantes 2A8/4B7

También se contempla que el anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano puede comprender combinaciones de las cadenas pesada y ligera de 2A8 y 4B7.

55 Por consiguiente se describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que dicho anticuerpo comprende: a) una cadena pesada de 2A8 que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera de 4B7 que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO:4, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Anteriormente, se han dado ejemplos de las modificaciones que se pueden introducir

También se describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que dicho anticuerpo comprende: a) una cadena pesada de 4B7 que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 3, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera de 2A8 que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Anteriormente, se han dado ejemplos de las modificaciones que se pueden introducir.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que dicho anticuerpo comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34.

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

Se proporcionan también moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos monoclonales antes descritos.

Por lo tanto, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en la que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido. Anteriormente, se han dado ejemplos de las modificaciones que se pueden introducir.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Anteriormente, se han dado ejemplos de las modificaciones que se pueden introducir.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en la que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 3, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido. Anteriormente, se han dado ejemplos de las modificaciones que se pueden introducir.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 4, en la que dicha secuencia de aminoácidos de cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Anteriormente, se han dado ejemplos de las modificaciones que se pueden introducir.

Asimismo, se proporcionan también vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos monoclonales antes descritos y células huésped que comprenden dichos vectores.

Procedimientos para preparar anticuerpos para TFPI

El anticuerpo monoclonal se puede producir por recombinación por expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica las regiones variables del anticuerpo monoclonal de acuerdo con las realizaciones de la invención en una célula huésped. Con la ayuda de un vector de expresión, se puede transfectar y expresar un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos en una célula huésped adecuada para la producción. Por consiguiente, se proporciona también un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal que se une a TFPI humano que comprende:

(a) transfección de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal de la invención en una célula huésped.

b) cultivo de la célula huésped para expresar el anticuerpo monoclonal en la célula huésped y, opcionalmente,

c) aislamiento y purificación del anticuerpo monoclonal producido, en el que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

En un ejemplo, para expresar los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo de los mismos, se insertan los ADN que codifican cadenas ligeras o pesadas parciales o de longitud completa obtenidas a través de técnicas de biología molecular convencionales en vectores de expresión, de manera que los genes quedan operativamente unidos a secuencias de control de transcripción y traducción. En este contexto, se pretende que el término "operativamente

unidos" signifique que un gen de anticuerpo se liga a un vector de manera que las secuencias de control de transcripción y de traducción dentro del vector cumplen su función de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan para que se sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores por separado o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión a través de métodos convencionales (p.ej. ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos, si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que codifican ya las regiones constante de cadena pesada y constante de cadena ligera de isotipo deseado, de manera que el segmento V_H se une operativamente al (los) segmento(s) C_H dentro del vector y el segmento V_L se une operativamente al segmento C_L dentro del vector. De forma adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo se puede clonar en un vector, de manera que el péptido de señal se une en fase de lectura al término amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

Además de los genes que codifican la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. Se pretende que la expresión "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p.ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen por ejemplo en Goeddel; Gene Expression Technology. Procedimientos in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las personas especializadas en la técnica podrán apreciar que el diseño del vector de expresión, incluyendo la sección de secuencias reguladoras puede depender de factores como puedan ser la selección de la célula huésped que se ha de transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Entre los ejemplos de secuencias reguladoras para expresión de célula huésped de mamífero se incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, como por ejemplo promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (VMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (p.ej., el promotor mayor tardío de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Alternativamente, se pueden utilizar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor ubiquitina o el promotor de β -globina.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante pueden llevar secuencias adicionales, como por ejemplo secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (p.ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, p.ej., las patentes estadounidenses Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas ellas de Axel y col.). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, como por ejemplo G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Entre los ejemplos de genes marcadores seleccionables se incluyen gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, se transfecta(n) el (los) vectores de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada en una célula huésped a través de técnicas convencionales. Se pretende que las distintas formas del término "transfección" abarquen una amplia gama de las técnicas utilizadas habitualmente para introducir un ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, p.ej. electroporación, precipitación de fosfato cálcico, transfección DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención tanto en células huésped procariotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, sobre todo preferentemente en células huésped de mamífero, es de preferencia sobre todo ya que dichas células eucariotas, y en particular las células de mamífero, presentan una mayor probabilidad de ensamblarse y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo que las células procariotas.

Entre los ejemplos de células huésped de mamífero para expresar anticuerpos recombinantes se incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, p.ej., tal como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS, células HKB11 y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, se producen los anticuerpos por cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para dar cabida a la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando procedimientos de purificación de proteínas convencionales, tales como ultrafiltración, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y centrifugación.

Uso de secuencias de anticuerpo parciales para expresar anticuerpos intactos

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácido que están localizados en seis CDR de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácido dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR a partir del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias de armazón a partir de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, p.ej., 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. Estados Unidos 86:10029-10033). Dichas secuencias de armazón se pueden obtener a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias del gen del anticuerpo de línea germinal. Dichas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias del gen del anticuerpo maduras, ya que no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por unión V(D)J durante la maduración de linfocitos B. No es necesario obtener la secuencia de ADN entera de un anticuerpo en particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase WO 99/45962). La secuencia de cadena pesada y ligera parcial que se extiende a las regiones CDR es normalmente suficiente para este fin. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué variable de línea germinal y segmentos de gen unidos han contribuido a los genes variables del anticuerpo recombinado. La secuencia de línea germinal se utiliza entonces para rellenar las porciones que faltan en las regiones variables. Las secuencias líderes de cadena ligera y pesada se dividen durante la maduración de proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Por esta razón, es necesario utilizar la secuencia líder de línea germinal correspondiente para las construcciones de expresión. Para añadir las secuencias que faltan, se pueden combinar secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos por ligación o por amplificación por PCR. Alternativamente, se puede sintetizar la región variable completa como un conjunto de oligonucleótidos cortos solapados y combinados por amplificación PCR, para crear un clon de la región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas como son la eliminación o inclusión de sitios de restricción en particular, o la optimización de codones en particular.

Las secuencias de nucleótidos de los transcritos de cadena pesada y ligera se utilizan para diseñar un conjunto solapado de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con idénticas capacidades de codificación de aminoácido que las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y ligera sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales. Por ejemplo, se interrumpen las cadenas de bases de nucleótidos repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación PCR; se incorporan los sitios de iniciación de la traducción óptimos de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); y se obtienen por ingeniería genética sitios de restricción corriente arriba o corriente abajo de los sitios de iniciación de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, las secuencias de cadena de codificación optimizadas, y las correspondientes no codificantes, se descomponen en secciones de 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, se pueden ensamblar los oligonucleótidos en conjuntos de doble cadena solapados que extienden los segmentos de 150-400 nucleótidos. Las agrupaciones se utilizan después como matrices para producir productos de amplificación PCR de 150-400 nucleótidos. Normalmente, se descompondrá un conjunto de oligonucleótidos de una sola región variable en dos agrupaciones que se amplifican por separado para generar dos productos PCR solapados. Estos productos solapados se combinan después por amplificación PCR para formar una región variable completa. Puede ser también deseable incluir un fragmento solapado de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación PCR para generar fragmentos que se pueden clonar fácilmente en construcciones de vector de expresión.

A continuación, se combinan las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas con las secuencias promotora, de iniciación de la traducción, región constante, 3' sin traducir, poliadenilación y terminación de transcripción clonadas para formar construcciones de vector de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, co-transfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células huésped que se funden después para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas.

Por tanto, en otro aspecto, las características estructurales del anticuerpo anti-TFPI humano se utilizan para crear anticuerpos anti-TFPI humanos estructuralmente relacionados que retienen la función de unión a TFPI. Más específicamente, se pueden combinar una o más CDR de las regiones de cadena pesada y ligera específicamente identificadas de los anticuerpos monoclonales de la invención por recombinación con regiones armazón y CDR humanas para crear anticuerpos anti-TFPI humanos obtenidos por ingeniería-recombinación adicionales de la invención.

Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan asimismo composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI y un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" es una sustancia que se puede añadir al principio activo para facilitar la formulación y estabilización de la preparación y que no causa ningún efecto toxicológico adverso significativo al paciente. Entre los ejemplos de dichos vehículos se incluyen los conocidos entre las personas especializadas en la técnica, como agua, azúcares como

maltosa o sacarosa, albúmina, sales como cloruro sódico, etc. En Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin, por ejemplo, se describen otros vehículos. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal anti-TFPI.

Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para su preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Preferentemente, se formula la composición para inyección parenteral. La composición se puede formular como una solución, una microemulsión, un liposoma u otras estructuras ordenadas adecuadas para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión, por ejemplo, con contenido en agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. En algunos casos, incluirá agentes isotónicos como por ejemplo azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes que se han enumerado, según se requiera, seguido de la microfiltración para esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios entre los que se han enumerado. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos métodos de preparación consisten en secado al vacío y deshidrocongelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo además de un ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada para esterilización del mismo.

Usos farmacéuticos

El anticuerpo monoclonal se puede utilizar para fines terapéuticos para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales en las realizaciones que se han descrito se pueden utilizar para bloquear la interacción de TFPI con FXa o para prevenir la inhibición dependiente de TFPI de la actividad TF/FVIIa. Asimismo, se puede emplear el anticuerpo monoclonal también para restaurar la generación activada por TF/FVIIa de FXa para evitar la insuficiencia de la amplificación de FXa dependiente de FVII o FIX.

Los anticuerpos monoclonales tienen un uso terapéutico en el tratamiento de trastornos de hemostasia como trombocitopenia, trastornos plaquetarios y trastornos hemorrágicos (p.ej. hemofilia A, hemofilia B y hemofilia C). Dichos trastornos se pueden tratar administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI a un paciente que lo necesita. Los anticuerpos monoclonales también tienen un uso terapéutico en el tratamiento de hemorragias incontroladas en indicaciones como traumatismo e ictus hemorrágico. Por tanto, se proporciona también un procedimiento para acortar el tiempo de hemorragia que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI de la invención a un paciente que lo necesita.

Los anticuerpos se pueden utilizar como monoterapia o en combinación con otras terapias para abordar un trastorno hemostático. Por ejemplo, se cree que la co-administración de uno o más anticuerpos de la invención con un factor coagulante como factor VIIa, factor VIII o factor IX es útil para el tratamiento de hemofilia. En una realización, se proporciona un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación que comprende la administración de (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano y (b) una segunda cantidad del factor VIII o factor IX, en el que dichas primera y segunda cantidades son eficaces en conjunto 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 la administración de (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une a un 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 son eficaces en conjunto para tratar dichas deficiencias o defectos y, además, en el que el factor VII no se co-administra. La invención incluye también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación de un anticuerpo monoclonal de la invención y factor VIII o factor IX, en la que la composición no contiene factor VII. "Factor VII" incluye factor VII y factor VIIa. Es probable que estas terapias de combinación reduzcan la frecuencia de infusión necesaria del factor de coagulación. Se entiende por co-administración o terapia de combinación la administración de dos fármacos terapéuticos formulados cada uno de ellos por separado o formulados combinados en una composición y, si se formulan por separado, administrados aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes, pero a lo largo del mismo período terapéutico.

En algunas realizaciones, se puede utilizar uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento en combinación para abordar un trastorno hemostático. Por ejemplo, se cree que la co-administración de dos o más de los anticuerpos descritos en el presente documento es útil para tratar hemofilia u otros trastornos hemostáticos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral a pacientes que padecen de hemofilia A o B, con una pauta y frecuencia que puede variar dependiendo de la gravedad del episodio hemorrágico o, en el caso de terapia profiláctica, según la gravedad de la deficiencia de coagulación del paciente.

Las composiciones se pueden administrar a pacientes que lo necesiten como un bolo o por infusión continua. Por ejemplo, la administración en bolo de un anticuerpo de la invención presente como un fragmento Fab puede ser una cantidad comprendida entre 0,0025 y 100 mg/kg peso corporal, entre 0,025 y 0,25 mg/kg, entre 0,010 y 0,10 mg/kg o 0,10-0,50 mg/kg. Para infusión continua, se puede administrar un anticuerpo de la invención presente como un fragmento Fab a entre 0,001 y 100 mg/kg peso corporal/minuto, entre 0,0125 y 1,25 mg/kg/min., entre 0,010 y 0,75 mg/kg/min., entre 0,010 y 1,0 mg/kg/min o 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 dosis pueden ser aproximadamente 1-10 mg/kg peso corporal, 2-8 mg/kg, o 5-6 mg/kg. Dichos anticuerpos de longitud completa se administrarán normalmente por infusión a lo largo de un período de treinta minutos a tres horas. La frecuencia de la administración dependerá de la gravedad de la afección. La frecuencia oscilará entre tres veces a la semana y una vez cada dos semanas a seis meses.

Adicionalmente, las composiciones se pueden administrar a los pacientes a través de una inyección subcutánea. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de 10 a 100 mg de anticuerpo anti-TFPI a pacientes por inyección subcutánea una vez a la semana, dos veces a la semana o mensualmente.

Tal como se utiliza en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI o la 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 causar de otro modo un beneficio medible *in vivo* a un paciente que lo necesita. La cantidad precisa dependerá de una serie de factores, entre los que se incluyen sin limitarse a ellos, los componentes y las características físicas de la composición terapéutica, la población del paciente objeto del tratamiento, consideraciones sobre cada paciente individual, y similares y pueden ser determinadas por las personas especializadas en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1. Clonación, expresión y cuantificación de los niveles de expresión de anticuerpo

Se subclonaron la cadena pesada y ligera de los Fab 2A8 y 4B7 de tipo silvestre que llevan la marca c-myc y hexahistidina en el término C de la cadena pesada en vector de expresión bacteriano pET28a (Novagen/Merck Chemicals Ltd., Nottingham, RU) y se transformaron en células Top10F⁺ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). Alternativamente, se pueden utilizar otros vectores de expresión bacteriana (p.ej. sistema de vector pQE, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y cepas (p.ej. DH5 α , Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). Se generaron variantes por oligo-mutagénesis dirigida a sitio convencional y se confirmaron por secuenciación de ADN. En particular, se modificaron los restos de aminoácido dentro o alrededor de regiones determinantes complementarias dentro de la cadena pesada y/o la cadena ligera.

Para poder usar los anticuerpos de tipo silvestre o mutante como competidores, se eliminaron o se sustituyeron las marcas de epítipo localizadas en el término C de la cadena pesada empleando técnicas basadas en PCR normales. En particular, para 4B7, la marca c-myc se cambió por una marca de epítipo hemaglutinina (HA) para todas las variantes analizadas. En cambio, 4B7 de tipo silvestre o las variantes utilizadas como competidores llevaron una marca c-myc. En el caso de 2A8, la marca de epítipo c-myc o bien fue sustituida por marca HA o bien fue suprimida, con el resultado de una variante que solamente presentó una marca de epítipo 6x histidina en su término C.

Para la expresión, se transformaron variantes en la cepa *Escherichia coli* BL21starDE3 (Invitrogen, C6010-03), se inocularon en un cultivo durante toda la noche en medio LB que contenía kanamicina (30 μ g/ml) y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Se generaron los cultivos de expresión inoculando el cultivo de toda la noche en medio LB nuevo 1:20 con kanamicina (30 μ g/ml). Al cabo de 6 horas, se añadió 1 mM isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido (Roth, 2316.5) para inducir la expresión de anticuerpo y se incubaron los cultivos durante 18 horas más a 30 °C. Alternativamente, se inocularon los cultivos 1:20 en el medio de autoinducción Overnight Express TB (Merck, 71491) y se incubó a 30 °C durante 24 horas.

Para cuantificar los niveles de expresión, se empleó un enfoque ELISA. Brevemente, se incubaron placas MTP (Nunc maxisorp negro, 460518) con un anticuerpo específico de Fab (Sigma, 15260), diluido en tampón de revestimiento (Candor Bioscience GmbH, 121500) a 4 °C durante toda la noche, se lavaron con PBST (solución salina tamponada con fosfato: 137 mM NaCl, Merck 1.06404.5000; 2,7 mM KC1, Merck 1.04936.1000; 10 mM Na₂HPO₄, Merck 1.06586.2500, 1,8 mM KH₂PO₄, Merck 1.04871.5000; que contenía 0,05 % Tween 20 Acros Organics, 233360010), se bloquearon con 2 % leche en PBST durante 1 h a temperatura ambiente y se volvieron a lavar. Se diluyeron los cultivos en 0,25 % leche desnatada (Fluka analytical, 70166) en PBS y se unieron a las placas MTP durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado con PBST, se incubaron los anticuerpos capturados con anticuerpo anti-Fab acoplado con HRP (Sigma, A0293) y se detectó por incubación de la placa con 10 μ M de sustrato rojo amplex (Invitrogen, A12222) durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, seguido de medida de la fluorescencia. Se normalizaron los niveles de expresión después de determinar la concentración en relación con el anticuerpo purificado de tipo silvestre (2A8 o 4B7).

Ejemplo 2. Determinación de la actividad y la reactividad cruzada entre especies de variantes de anticuerpo

generadas

Para determinar la actividad de las variantes de anticuerpo mutadas sobre TFPI humano o de ratón (American Diagnostica, 4900B y R&D Systems, 2975-P1, respectivamente) se utilizó un formato de ensayo ELISA en equilibrio o competitivo. Brevemente, se revistieron placas MTP (Mesoscale Discovery, L21XA-4 o Nunc maxisorp negro, 460518) con 0,04-2 µg/ml de TFPI humano o de ratón diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en tampón de revestimiento (Candor Bioscience GmbH, 121500), respectivamente y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Después de lavado, se bloquearon las placas con 3 % de albúmina de suero bovino (Sigma, A4503) en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente y se repitió la etapa de lavado. Para la unión de los anticuerpos, se añadieron 10-25 µl de los sobrenadantes de cultivo normalizados a su nivel de expresión de anticuerpo correspondiente (si no se indica de otra forma) a las placas, durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado con PBST. A continuación, se detectaron el tipo silvestre y las variantes unidos con un anticuerpo específico de marca de epítipo o se incluyó una etapa de competición. Para la competición, se añadieron 50-300 nM de competidor o antígeno libre y se incubó durante entre 20 minutos y 24 horas a temperatura ambiente. Después de lavado, se detectaron las variantes restantes con un anticuerpo específico de marca de epítipo acoplado a peroxidasa de rábano rusticano (Biomol, anti-c-myc A190-105P para variantes 2A8 y anti-HA A190-108P para variantes 4B7) o con un anticuerpo anti-myc (Sigma, C3956) o un anticuerpo anti-HA (Sigma, H6908) que se marcó previamente con un reactivo sulfo-NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detección electroluminiscente (Mesoscale Discovery, R91AN-1). Para la detección de señal en placas maxisorp, se añadieron 10 µM de sustrato rojo amplex (Invitrogen, A12222) y se incubó durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad seguido de medida de la fluorescencia. Para la detección en placas MSD, se diluyó tampón T de lectura MSD 2x en H₂O (Mesoscale Discovery, R92TC-1), se añadió a las placas y se detectó la señal de electroquimioluminiscencia a 620 nm utilizando un generador de imágenes Mesoscale Discovery Sector 6000.

Ejemplo 3. Sustituciones simples y múltiples de aminoácido

En la Tabla 1 se proporcionan varios ejemplos de sustituciones de aminoácido simples introducidas en la cadena pesada o ligera de 2A8. Se analizó el nivel de expresión de las variantes por cuadruplicado en ELISA de cuantificación. Después de la normalización hasta el nivel de expresión correspondiente, se analizó el comportamiento por cuadruplicado en la prueba ELISA competitiva sobre TFPI humano y murino y se determinó las relaciones entre la variante y el tipo silvestre (wt). Se calcularon los errores por propagación de error desde las desviaciones típicas.

Tabla 1. Análisis de sustituciones de aminoácido simples dentro de 2A8.

variantes 2A8	hTFPI		mTFPI	
	variante/tipo silvestre	error	variante/tipo silvestre	error
HC_S31P	3,6	0,5	2,4	0,3
HC_S31V	9,7	1,1	7,4	4,1
HC_G33K	1,8	0,2	0,7	0,1
HC_G33P	5,1	0,6	2,9	0,4
HC_S35L	1,7	0,1	1,5	0,2
HC_S35D	4,3	0,6	2,6	0,6
HC_I51D	3,9	0,3	1,4	0,2
HC_I51E	7,3	0,6	0,7	0,1
HC_S54F	6,5	0,6	3,1	0,6
HC_S54D	1,7	0,2	1,2	0,2
HC_S55A	2,0	0,3	1,2	0,2
HC_S55R	4,4	1,1	2,1	0,3
HC_K99V	7,5	0,9	3,9	0,5
HC_K99L	13,5	1,4	10,8	2,8

(continuación)

variantes 2A8	hTFPI		mTFPI	
	variante/tipo silvestre	error	variante/tipo silvestre	error
HC_F104Y	2,0	0,3	2,0	0,2
LC_A32N	3,5	0,4	3,2	0,3
LC_Y48F	4,6	0,6	2,0	0,7
LC_N51V	4,4	0,4	1,5	0,4
LC_N52G	3,4	0,5	2,7	0,2
LC_P54L	5,3	0,8		0,5
LC_D91L	4,2	0,3	1,6	0,5
LC_D91R	3,1	0,5	2,0	0,3
LC_D91W	7,4	0,7	4,0	0,7
LC_D91K	3,5	0,4	1,4	0,2
LC_D92S	3,8	0,5	2,6	0,3
LC_D92T	2,6	0,4	1,2	0,2
LC_V96G	3,2	0,4	1,2	0,2
LC_V96M	3,5	0,5	1,5	0,2
LC_V96W	4,0	0,4	4,3	0,6
HC_S31P	3,6	0,5	2,4	0,3
HC_S31V	9,7	1,1	7,4	4,1
HC_G33K	1,8	0,2	0,7	0,1
HC_G33P	5,1	0,6	2,9	0,4
HC_S35L	1,7	0,1	1,5	0,2
HC_S35D	4,3	0,6	2,6	0,6
HC_I51D	3,9	0,3	1,4	0,2
HC_I51E	7,3	0,6	0,7	0,1
HC_S54F	6,5	0,6	3,1	0,6
HC_S54D	1,7	0,2	1,2	0,2
HC_S55A	2,0	0,3	1,2	0,2
HC_S55R	4,4	1,1	2,1	0,3
HC_K99V	7,5	0,9	3,9	0,5
HC_K99L	13,5	1,4	10,8	2,8
HC_F104Y	2,0	0,3	1,5	0,2
LC_A32N	3,5	0,4	2,0	0,3
LC_Y48F	4,6	0,6	3,2	0,7
LC_N51V	4,4	0,4	2,0	0,4
LC_N52G	3,4	0,5	1,5	0,2
LC_P54L	5,3	0,8	2,7	0,5

(continuación)

variantes 2A8	hTFPI		mTFPI	
	variante/tipo silvestre	error	variante/tipo silvestre	error
LC_D91L	4,2	0,3	1,6	0,5
LC_D91R	3,1	0,5	2,0	0,3
LC_D91W	7,4	0,7	4,0	0,7
LC_D91K	3,5	0,4	1,4	0,2
LC_D92S	3,8	0,5	2,6	0,3
LC_D92T	2,6	0,4	1,2	0,2
LC_V96G	3,2	0,4	1,2	0,2
LC_V96M	3,5	0,5	1,5	0,2
LC_V96W	4,0	0,4	4,3	0,6

En la Tabla 2 se dan algunos ejemplos de sustituciones de aminoácido combinadas dentro de anticuerpos TFPI 2A8. Si bien en la Tabla 2 no se proporcionan todas las combinaciones, se contempla que el anticuerpo TFPI pueda comprender cualquier combinación de las modificaciones proporcionadas. Se analizó el nivel de expresión de las variantes por cuadruplicado por ELISA de cuantificación. Si no se indica de otro modo, se normalizaron las variantes al nivel de expresión correspondiente y se analizó el comportamiento por cuadruplicado por ELISA competitiva sobre TFPI humano y murino seguido del cálculo de las relaciones entre la variante y la referencia (HC_K99L). Los valores se marcan "#" cuando se analizó el comportamiento de la variante sin previa normalización y se normalizaron las relaciones entre las variantes y la referencia al nivel de expresión dividiendo la señal de ensayo por el nivel de expresión. En los casos en los que se utilizó una referencia diferente en ELISA competitiva y se analizaron las variantes sin normalización previa, los valores fueron marcados con "*". Para estas variantes, el valor enumerado en la tabla fue calculado multiplicando las relaciones variante/referencia alternativa por referencia alternativa/HC_K99L. Se calcularon los errores por propagación de error desde desviaciones típicas.

Tabla 2. Ejemplo de sustituciones de aminoácido múltiples dentro de 2A8.

2A8 HC												2A8 LC																hTFPI		mTFPI							
Q1	R30	S31	G33	M34	S35	S60	I51	R52	S54	S55	S56	K99	D01	I12	A13	S21	N26	R28	N29	H33	Y48	Y49	N51	N52	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	P95	V96	Variante_HC_K99L	erro	Variante_HC_K99L	error
		V				D		F			V										F		V											8,1#	0,4	2,2#	0,4
			P		D			F			L										F			G										6,2#	1,4	2,3#	0,8
					D	D			R		V										F		V											8,0#	0,5	2,7#	0,4
					L			F			V										F								K					5,0#	0,6	3,1#	0,5
		V	P		D																F								L				W	22,5#	1,6	5,9#	1,3
					D	D					L										F								W					0,8#	0,1	0,2#	0,0
		V				D			R		L										F			G					L				W	0,4#	0,1	0,1#	0,0
		V			D	D					V										F								K					0,6#	0,0	0,1#	0,0
			P			D		F													F		V										W	0,6	0,2	0,4	0,1

ES 2 765 418 T3

(continuación)

2A8 HC													2A8 LC																hTFPI		mTFPI								
Q1	R30	S31	G33	M34	S35	S50	151	R52	S54	S55	S56	K99	D01	I12	A13	S21	N26	R28	N29	H33	Y48	Y49	N51	N52	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	P95	V96	Variante_HC_K99L	erro	Variante_HC_K99L	error		
							D		F			L																	W						6,2	1,6	5,3	1,2	
		V			D				F												F								L				W	5,4	1,6	4,2	1,0		
					D							L																	L					W	7,1	1,9	5,4	1,3	
		V	P				D		F			V									F		V					W							6,6	0,7	5,9	0,9	
					D		E			R		L									F		V					L						W	10,4	1,3	8,0	1,6	
		V										V											V					W							6,7	0,9	5,6	1,0	
		V					E			R		V									F							L						W	9,2	1,0	7,0	1,9	
					D							L									F		V		D									W	18,8	2,1	18,7	2,6	
		V							F			L											V												16,3	1,8	15,7	2,6	
		V	P		D																F		V					L							12,2	1,1	11,7	2,2	
					D					R		L									F		V					L						W	17,8	2,1	13,4	5,4	
		V			D					R											F		V					L						W	8,7	0,9	8,2	3,9	
		V			D																F		V												7,5	0,9	7,2	1,9	
		V					D			R											F		V					L							8,4	0,9	6,5	1,4	
					D				F	R		L																L						W	14,9	1,6	12,1	4,8	
		V			L		D		F			V											V					K							8,6	1,0	8,2	1,4	
		V			L		E		F			V											V					K							4,9	0,6	3,9	0,7	
					D							L																							3,9	0,7	4,5	0,7	
					D							L									F							L						W	18,8	1,7	18,2	3,4	
		V					D			R		V									F							L							W	16,4	1,5	11,9	4,0
					D					R		L									F		V					W							19,7	2,2	17,4	3,8	
					D					R		L	S								F		V					W							21,9*	5,3	22,0*	8,9	
					D					R		L		Y							F		V					W							18,7*	4,2	19,0*	6,8	
					D					R		L			S						F		V					W							20,1*	6,2	19,9*	7,4	
					D					R		L				T					F		V					W							19,5*	4,5	18,8*	6,6	
					D					R		L					A				F		V					W							4,1*	1,1	4,1*	1,5	

ES 2 765 418 T3

(continuación)

2A8 HC												2A8 LC																		hTFPI		mTFPI								
Q1	R30	S31	G33	M34	S35	S50	I51	R52	S54	S55	S56	K99	D01	I12	A13	S21	N26	R28	N29	H33	Y48	Y49	N51	N52	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	P95	V96	Variante_HC_K99L	erro	Variante_HC_K99L	error			
					D					R		L						P			F		V					W							22,0*	5,7	23,2*	9,1		
					D					R		L							K		F		V					W							20,0*	5,8	18,9*	7,1		
					D					R		L								Y	F		V					W								14,0*	3,4	11,2*	4,4	
					D					R		L									F		V				M	W								23,1*	5,5	21,2*	7,5	
					D					R		L									F		V					A	W								18,6*	5,0	18,2*	6,8
					D					R		L									F		V					W	S								23,9*	6,3	22,8*	7,6
					D					R		L									F		V					W		S							17,0*	4,0	16,5*	5,9
					D					R		L									F		V					W			T						22,8*	6,4	19,9*	8,0
					D					R		L									F		V					W				V					15,7*	3,9	13,7*	5,1
					D					R		L									F		V					A	W	S	S	T	A				10,9*	3,1	9,0*	4,0
E					D					R		L									F		V					W									20,9*	5,3	20,3*	7,4
	S				D					R		L									F		V					W									17,9*	4,5	19,1*	6,9
			A		D					R		L									F		V					V									16,0*	3,6	14,7*	5,2
				1	D					R		L									F		V					V									19,6*	4,9	18,1*	6,8
				K	D					R		L									F		V					V									11,2*	2,8	11,6*	4,1
					D	A				R		L									F		V					V									10,9*	2,8	12,6*	4,4
					D			S		R		L									F		V					V									10,1*	2,7	7,9*	2,7
					D					R	G	L									F		V					V									21,4*	5,2	18,7*	7,2
E	S				D					R	G	L	S	Y	S	T		P	K		F		V				W	A	V	S	S	T				18,3*	4,6	13,3*	4,3	
E	S				D					R	G	L									F		V					V									11,9*	2,1	9,3*	2,9
					D					R		L	S	Y	S	T		P	K		F		V				W	A	V	S	S	T				21,4*	3,6	16,8*	5,8	
E	S				D					R	G	L	S	Y	S	T		P			F		V				W	A	V	S	S	T				18,8*	4,4	12,3*	3,5	
E	S				D					R	G	L	S	Y	S	T		P	K		F		V				V		V							19,8*	3,3	15,5*	4,8	
E	S				D					R	G	L	S	Y	S	T		P			F		V				V		V							18,7*	3,4	15,1*	4,6	
					D							L									F		S					L					V	19,9*	4,0	20,3*	5,7			
					D							L									F							A	L					V	4,4*	1,3	6,1*	1,7		
					D							L									F							L	S				W	20,7*	4,1	20,5*	6,7			

(continuación)

2A8 HC													2A8 LC																hTFPI		mTFPI							
Q1	R30	S31	G33	M34	S35	S50	151	R52	S54	S55	S56	K99	D01	I12	A13	S21	N26	R28	N29	H33	Y48	Y49	N51	N52	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	P95	V96	Variante_HC_K99L	erro	Variante_HC_K99L	error	
					D							L									F							L		S			W	14,2*	2,7	15,6*	4,2	
					D							L									F							L			T		W	18,6*	4,0	19,3*	5,4	
					D							L									F							L				V	W	10,2*	2,1	13,6*	4,6	
					D	A						L									F							L						W	4,0*	0,9	4,6*	1,3
					D		S					L									F							L						W	3,9*	1,2	3,0*	1,0
					D					G		L									F							L						W	18,1*	4,3	18,2*	5,8
					D						G	L									F							L						W	17,8*	4,2	16,9*	5,0
E	S				D					G	G	L									F							L						W	13,6*	2,8	10,6*	3,6
	S	V				D				R		V									F							L						W	13,5*	2,8	6,5*	3,3
		V	A			D				R		V									F							L						W	9,0*	2,0	4,7*	2,3
		V				A	D			R		V									F							L						W	16,6*	3,8	9,3*	4,3
		V				D	S			R		V									F							L						W	11,7*	2,9	7,9*	4,6
		V				D				R	G	V									F							L						W	16,2*	3,9	12,1*	6,0
E		V				A	D			R	G	V									F							L						W	12,1*	2,8	7,7*	3,8
		V				D				R		V	S	Y	S	T		P	K		F	R	S			M		L	S		T		W	2,2*	0,9	2,4*	1,4	
E		V				A	D			R	G	V	S	Y	S	T		P	K		F		S			M		L	S		T		W	11,4*	2,7	7,1*	3,6	
E		V				A	D			R	G	V	S	Y	S	T		P	K		F					M		L	S		T		W	9,8*	2,5	5,9*	2,0	
		V				D				R		V	S	Y	S	T		P	K		F		S			M		L	S		T		W	19,6*	3,5	21,4*	9,6	
		V				D				R		V	S	Y	S	T		P	K		F					M		L	S		T		W	18,0*	4,9	15,4*	7,6	

En la Tabla 3 se dan varios ejemplos de sustituciones simples y/o dobles de aminoácido introducidas en la cadena pesada y/o ligera de 4B7. Se analizó el nivel de expresión de las variantes por cuadruplicado en la prueba ELISA de cuantificación. Después de la normalización al nivel de expresión correspondiente, se analizó el comportamiento por cuadruplicado en ELISA competitiva sobre TFPI humano y en ELISA en equilibrio sobre TFPI murino seguido de la determinación de las relaciones entre las variables y el tipo silvestre. Los errores se calcularon por propagación de error desde desviaciones típicas.

Tabla 3. Análisis de sustituciones simples o dobles de aminoácido dentro de 4B7

variantes 4B7	hTFPI		mTFPI	
	variante/tipo silvestre	error	variante/tipo silvestre	error
HC_N32D	3,8	0,7	6,0	2,9

(continuación)

	hTFPI		mTFPI	
variantes 4B7	variante/tipo silvestre	error	variante/tipo silvestre	error
HC_N32E	3,2	1,0	2,1	0,3
HC_S33G	1,5	0,3	6,5	1,2
HC_S57K	1,7	0,4	6,5	1,1
HC_S57R	2,0	0,4	6,6	1,4
HC_D62I	9,8	1,6	44,4	11,6
HC_D62R	32,3	4,5	230,2	34,1
HC_D62L	6,8	1,2	22,9	6,1
HC_D62Q	20,6	2,8	142,5	28,0
HC_D62S	29,3	4,3	146,5	40,4
HC_H103D	2,4	0,4	12,9	2,0
HC_H103G	1,4	0,3	10,7	2,0
HC_Y112D	2,9	0,6	5,7	1,3
LC_S32R	4,2	0,7	7,8	1,5
LC_S32Y	2,0	0,4	6,7	1,2
LC_D33F	5,3	1,3	7,0	2,6
LC_D33R	3,6	0,7	7,2	1,9
LC_N35I	3,6	0,7	7,1	1,5
LC_N35L	2,1	1,0	6,0	1,3
LC_N35T	5,4	1,0	3,4	1,1
LC_Y37F	3,6	0,7	1,9	0,6
LC_S57Y	1,6	0,4	2,2	0,4
LC_S61C	3,1	0,5	15,3	4,2
LC_D97M	2,4	0,5	1,3	0,4
LC_D97T	1,8	0,3	5,5	1,6
HC_N61G	2,2	0,5	1,4	0,3
HC_D62V	31,9	5,6	95,0	20,4
HC_D62N	52,3	9,5	146,4	28,9
HC_H107M	8,1	1,6	5,6	1,7
LC_F31I	9,1	2,1	23,6	4,3
LC_F31M	1,7	0,4	1,3	0,4
LC_N35V LC_G56D	1,9	0,4	8,2	1,7
LC_N35L LC_G56A	3,1	0,7	6,9	1,6
LC_D33F LC_Y54F	4,3	0,9	7,9	1,9
HC_S30R HC_S57K	1,6	0,3	6,6	1,1
HC_N61G HC_D62V	8,0	1,1	31,1	9,1

(continuación)

	hTFPI		mTFPI	
variantes 4B7	variante/tipo silvestre	error	variante/tipo silvestre	error
HC_H107M LC_F31I	3,7	0,7	9,2	2,7
HC_G109A LC_D33R	3,8	0,6	8,0	1,3
HC_N61T LC_G167C	2,8	0,4	6,4	1,6
HC_K58M HC_D62N	6,6	1,2	15,2	4,5

En la Tabla 4 se dan algunos ejemplos de combinaciones de sustituciones de aminoácido dentro de anticuerpos TFPI 4B7. Si bien en la Tabla 4 no se proporcionan todas las combinaciones, se contempla que el anticuerpo TFPI pueda comprender cualquier combinación de las modificaciones proporcionadas. Se analizó el nivel de expresión de las variantes por cuadruplicado por ELISA de cuantificación. Si no se indica de otro modo, se normalizaron las variantes al nivel de expresión correspondiente y se analizó el comportamiento por cuadruplicado por ELISA competitiva sobre TFPI humano y murino seguido del cálculo de las relaciones entre la variante y la referencia (HC_D62R). En los casos en los que se utilizó una referencia diferente y se analizaron las variantes sin normalización previa, los valores fueron marcados con “*”. Para estas variantes, el valor enumerado en la tabla fue calculado multiplicando las relaciones variante/referencia alternativa por referencia alternativa/HC_D62R. Se calcularon los errores por propagación de error desde desviaciones típicas. nb: no se detectó unión en las condiciones de ensayo utilizadas.

Tabla 4. Ejemplo de sustituciones de aminoácido múltiples dentro de 4B7.

HC 4B7										LC 4B7																		hTFPI		mTFPI		
Q1	N32	S37	G44	I53	K55	D62	H103	H107	Y112	M4	V30	F31	S32	D33	N35	I36	Y37	N39	L42	K44	Q50	I51	K55	G56	A60	O97	S98	variante/HC_D62R	error	variante/HC_D62R	error	
	D					R			D				R		I														26,1	2,2	30,1	4,3
	D					R		M	D			I	R		I												T		18,2	3,6	8,7	1,4
	D					R			D					R	I														22,9	2,5	19,5	3,2
	D					S		M	D				R	R	T														19,6	1,9	20,3	3,2
	D					R	D					I		R															13,6	1,4	14,6	2,4
						R		M	D					F	I														20,0	3,4	36,6	9,8
	D					R			D					F	I												T		25,5	1,7	15,9	2,6
	D					R			D			I		F	I												T		23,3	3,1	11,9	2,2
						R		M	D			M		F															24,2	1,8	31,3	5,0
						R		M	D			I		R	I														22,0	2,2	35,4	5,0
	D					R	D	M	D				R		T														14,0	1,7	18,4	2,7
	D					Q			D			M	R	F	I														20,8	1,6	15,8	2,1
	D					R			D				R	F	I														29,7	2,2	42,0	5,9
	D					R		M	D				R	F	T														29,2	1,9	44,1	7,2

ES 2 765 418 T3

(continuación)

HC 4B7												LC 4B7																hTFPI		mTFPI	
Q1	N32	S37	G44	153	K55	D62	H103	H107	Y112	M4	V30	F31	S32	D33	N35	136	Y37	N39	I_42	K44	Q50	151	K55	G56	A60	097	S98	variante/HC_D62R	error	variante/HC_D62R	error
	D					Q		M	D					R	T													23,7	1,4	18,8	3,2
	D					Q		M	D				R		T													25,0	2,0	27,1	5,0
	D					R		M					R	R	I													12,9	1,4	16,1	2,4
	D					R		M	D			I		R	I													29,8	2,9	43,0	7,0
	D					R			D			M	R	R	I													15,8	1,0	11,2	2,0
						R			D					F	I													20,3	1,5	20,8	3,6
	D					R		M	D			I		R														30,1	1,6	27,9	6,9
	D					R		M	D			M	L	R	I											T		32,2	3,1	26,7	4,5
	D					R		M	D			M		F	I													28,4	2,2	46,8	7,6
	D					Q		M	D			M	R	F	I											T		19,0	1,8	12,0	2,9
	D					R			D						T											T		26,0	3,2	9,5	2,9
	D					R		M	D			M		R														26,9	2,9	24,6	4,7
	D					R		M	D			M		R	I													21,3	1,8	23,0	8,6
	D					R		M	D			M		F	T													29,9	2,2	34,3	5,6
						Q			D				R	F	I													23,6	1,9	38,1	5,7
	D					Q			D				R	R	I													21,4	1,5	23,5	4,4
	D					R		M	D			I			I													28,8	2,6	30,0	5,2
	D					Q		M	D				R	F	I													24,7	4,2	46,6	6,2
	D					Q			D			I		F	I													22,4	3,0	14,0	5,6
						R		M	D			M		F	I													30,9	3,0	47,0	7,9
	D					Q		M	D			I	R	R	I											T		20,2	1,7	11,5	1,9
						R		M	D						T											T		20,1	2,1	19,4	3,4
	D					R		M	D			M	R	R														18,6	1,4	13,9	2,1
	D					R		M	D			I	R	F	I											T		28,7	3,2	20,6	5,0
	D					R	D	M	D				R															17,7	1,4	16,0	2,9

ES 2 765 418 T3

(continuación)

HC 4B7											LC 4B7																	hTFPI		mTFPI		
Q1	N32	S37	G44	153	K55	D62	H103	H107	Y112	M4	V30	F31	S32	D33	N35	136	Y37	N39	L42	K44	Q50	151	K55	G56	A60	097	S98	variante/HC_D62R	error	variante/HC_D62R	error	
	D					Q			D				R	R	I												T		17,2	1,0	13,4	1,9
						R		M	D				R	F	I														24,1	2,5	50,3	6,6
	D					R		M	D			I	R	F	T														29,5	2,9	19,7	3,5
	D					Q		M	D				R	R															24,9	2,3	24,7	3,2
	D					R		M	D			M	R	R	I												T		16,9	1,5	9,6	1,7
	D					R		M	D				R		T												T		27,7	2,5	15,8	2,5
	D					R		M	D			M	R	F													T		21,9	1,7	16,5	3,7
	D					R		M	D			M	R	R	T														17,0	2,1	18,7	2,5
						S		M	D				R	F	I														18,2	3,5	31,7	5,7
						R		M	D			I	R	F	I												T		20,4	2,5	18,2	2,6
	D					O		M	D			M		F	T		F												19,4	3,2	35,3	5,6
	D					R			D				R	R															14,8	2,7	7,2	1,3
	D					R		M	D					F	T		F												35,7	4,3	57,5	9,1
	D					Q		M	D						I														22,2	1,6	16,4	2,5
	D					O		M	D				R	F															23,2	1,7	16,9	3,8
	D					R		M	D					R															25,3	2,6	20,3	2,6
						O		M	D					F	I														22,7	1,4	31,7	5,1
	D					R		M	D					R	I												T		29,1	1,8	28,1	4,9
	D					R		M	D				R		T														25,3	2,8	29,3	4,8
	D					R		M	D					R	T														28,2	2,7	29,3	4,5
	D					R			D				R	F	I												T		26,2	2,9	40,0	6,1
	D					R		M	D			M	R	F	I														27,0	1,5	32,3	4,9
						R			D				R	F	I														21,9	2,0	39,9	5,9
	D					R			D	L			R	F	I												T		21,3*	6,7	23,9*	4,7
	D					R			D	I			R	F	I												T		19,3*	5,3	12*	2,8
	D					R			D		L		R	F	I												T		26,1*	7,6	42,2*	10,1

ES 2 765 418 T3

(continuación)

HC 4B7												LC 4B7																		hTFPI		mTFPI	
Q1	N32	S37	G44	153	K55	D62	H103	H107	Y112	M4	V30	F31	S32	D33	N35	136	Y37	N39	L42	K44	Q50	151	K55	G56	A60	097	S98	variante/HC_D62R	error	variante/HC_D62R	error		
	D					R			D			H	R	F	I												T		22,1*	6,8	15,2*	3,2	
	D					R			D			Y	R	F	I												T		27,9*	9,8	39,7*	10,4	
	D					R			D				R	F	I	D											T		25,2*	7,6	35,4*	8,8	
	D					R			D				R	F	I			D									T		1,3*	0,5	nb	0,0	
	D					R			D				R	F	I				Q								T		26,9*	7,6	43*	10,5	
	D					R			D				R	F	I					R							T		26*	8,1	40,1*	9,1	
	D					R			D				R	F	I						R						T		25,9*	7,4	39,4*	10,4	
	D					R			D				R	F	I							R					T		11,2*	3,6	5,2*	1,5	
	D					R			D				R	F	I								L				T		7,8*	2,0	nb	0,0	
	D					R			D				R	F	I									V			T		12,1*	3,4	nb	0,0	
	D					R			D				R	F	I											D	T		19,1*	6,2	14,3*	3,6	
	D					R			D				R	F	I												T	H	17,9*	5,3	7,1*	1,7	
F	D					R			D				R	F	I												T		26,7*	9,0	39,8*	8,9	
	D	D				R			D				R	F	I												T		1,9*	0,7	nb	0,0	
	D		S			R			D				R	F	I												T		26,5*	8,1	41,5*	10,2	
	D			T		R			D				R	F	I												T		19,6*	6,0	8,3*	2,3	
	D				Y	R			D				R	F	I												T		25,6*	8,5	42,8*	10,4	
	D					K			D				R	F	I												T		22,7*	7,1	38,8*	8,8	
	D					Q			D				R	F	I												T		23,2*	7,0	40*	8,8	
F	D		S		Y	R			D		L		R	F	I	D											T		20,4*	5,3	29,4*	6,3	
	D					R			D		L		R	F	I	D											T		23,9*	4,9	28,4*	8,2	
F	D		S		Y	R			D				R	F	I												T		26,3*	4,8	45,1*	9,6	
	D					Q			D		I	I		F	I														22,9*	8,0	24,6*	12,8	
	D					O			D			I		F	I	D													27,3*	8,9	46,3*	23,5	
	D					Q			D			I		F	I				Q										21,4*	6,9	16,7*	8,9	
	D					Q			D			I		F	I					R									22,8*	7,9	18,5*	9,6	

(continuación)

HC 4B7										LC 4B7																		hTFPI		mTFPI		
Q1	N32	S37	G44	153	K55	D62	H103	H107	Y112	M4	V30	F31	S32	D33	N35	136	Y37	N39	L42	K44	Q50	151	K55	G56	A60	O97	S98	variante/HC_D62R	error	variante/HC_D62R	error	
	D					Q			D			I		F	I												T		14,4*	4,2	4,6*	2,5
	D					Q			D			I		F	I												H		13,5*	4,8	nb	0,0
	D			T		Q			D			I		F	I														5,7*	1,5	nb	0,0
	D				Y	Q			D			I		F	I														25,6*	9,0	26,2*	13,3
E	D		S		Y	R			D		L		R		I	D													23*	5,0	9,9*	3,3
	D					R			D		L		R		I	D													25*	4,3	7*	4,2
E	D		S		Y	R			D				R		I														22,6*	3,9	25,5*	5,8

Ejemplo 4. Purificación de anticuerpos

Se recogieron células por centrifugación a 9000 rpm durante 30 min a 4 °C y se almacenaron a -20 °C. Se intercambió-tamponó el sobrenadante con tampón A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 8,0), se concentró y se purificó aplicando un procedimiento de purificación en dos etapas. Brevemente, se cargaron 100 ml de sobrenadante concentrado en una columna de superflujo de 5 ml Ni-NTA (Qiagen, 1018142) se lavó primero con 5 x volúmenes de columna de tampón A seguido de 5 x volúmenes de columna de tampón B al 4,3 % (50 mM NaH₂PO₄ 300 mM NaCl, 250 mM imidazol pH 8,0) y se eluyó con 7 volúmenes de tampón B. Se combinan las fracciones y se dializaron en PBS. En una segunda etapa de purificación se incubaron los anticuerpos purificados con Ni-NTA con una matriz de afinidad específica de cadena ligera, es decir, selección de captura lambda o kappa (BAC 0849.010 y BAC 0833.10, respectivamente) para 2A8 y 4B7, respectivamente. Tras la incubación a 4 °C durante toda la noche, se cargó la matriz en una columna, se lavó con 5 volúmenes de PBS, 5 volúmenes de 500 mM de arginina 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl pH 6,0 y de nuevo 5 volúmenes de PBS. Se eluyeron los anticuerpos con 6 volúmenes de 100 mM glicina pH 3,0 seguido de 3 volúmenes de 100 mM glicina pH 2,0 en 1/10 del volumen total de 1M HEPES pH 7,5 para neutralizar los eluatos. Finalmente, se dializaron los eluatos en PBS durante toda la noche a 4 °C. Se analizaron los anticuerpos purificados por SDS-PAGE y espectrometría de masa.

Ejemplo 5. Medida de la afinidad de la unión de anticuerpo a TFPI utilizando resonancia de plasmon superficial (Biacore)

Se inmovilizó TFPI humano o de ratón en la superficie para análisis. Se utilizaron chips CM5 y un kit de acoplamiento de amina (GE HealthCare) para la inmovilización del ligando de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de TFPI inmovilizada fue aproximadamente 70 UR para adaptarse a la masa de anticuerpo que podría generar RMax de 100 UR. Los anticuerpos anti-TFPI parentales y madurados con afinidad estaban en la fase móvil. Se llevó a cabo la determinación de afinidad con al menos cinco concentraciones diferentes (0,1, 0,4, 1,6, 6,4 y 25 nM) de los anticuerpos modificados.

Al analizar las variantes de anticuerpo que contienen mutaciones simples en regiones CDR, los autores de la invención identificaron muchos clones que tenían una señal superior en el ensayo de unión ELISA. Se purificaron clones seleccionados y se analizó su afinidad para TFPI humano o de ratón utilizando Biacore. Tal como se muestra en la Tabla 5 y la Tabla 6, estos clones tienen una afinidad superior para TFPI que la de los anticuerpos parentales 2A8 o 4B7. Aunque algunos de los mutantes 2A8 tienen una velocidad de asociación más lenta (ka) que el anticuerpo parental 2A8, todos estos mutantes tienen una velocidad de disociación mucho más lenta (kd) que 2A8. En general, estas mutaciones simples aumentan la afinidad de 2A8 en el intervalo de 1,47 veces más a 7,22 veces más en TFPI humano y 1,71 veces más a 7,20 veces más en TFPI de ratón. Cuando se analizaron las variantes 4B7, la mutación D62R en el dominio CDR2 de cadena pesada aumentó significativamente la señal. Este clon fue seleccionado para medir la afinidad. Tal como se muestra en la Tabla 5 y en la Tabla 6, ésta sola mutación aumenta la afinidad de 4B7 para TFPI humano de 11,1 nM a 58,2 pM, una mejora de 191 veces más. La velocidad de

disociación lenta (kd) de 4B7HcD62R contribuye principalmente a su mejora de afinidad de $8,40 \times 10^{-3}$ /s de 4B7 a $1,65 \times 10^{-4}$ de 4B7HcD62R, una mejora de aproximadamente 50 veces más. De manera similar, esta mutación aumenta la afinidad de 4B7 a una TFPI de ratón de 58,6 nM a 427 pM, una mejora de 137 veces más.

Tabla 5. Afinidad de variantes 2A8 o 4B7 seleccionadas (mutación simple) en TFPI humano

Muestra	Clon	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Mejora
2A8-1	HC_G33P	2,71E+06	2,24E-03	8,27E-10	2,70
2A8-2	HC_S31P	2,91E+06	3,33E-03	1,15E-09	1,95
2A8-3	HC_S31V	3,84E+06	1,43E-03	3,73E-10	6,00
2A8-4	HC_S35D	4,01E+06	3,80E-03	9,50E-10	2,35
2A8-6	HC_I51E	1,29E+06	1,62E-03	1,26E-09	1,78
2A8-7	HC_S54F	2,81E+06	2,04E-03	7,27E-10	3,08
2A8-8	HC_S55R	4,30E+06	3,94E-03	9,17E-10	2,44
2A8-9	HC_K99L	2,60E+06	8,03E-04	3,09E-10	7,22
2A8-10	HC_K99V	2,55E+06	2,54E-03	9,95E-10	2,25
2A8-11	LC_A32N	2,70E+06	4,10E-03	1,52E-09	1,47
2A8-12	HC_I51D	3,61E+06	4,95E-03	1,37E-09	1,63
2A8-13	LC_N51V	4,26E+06	2,20E-03	5,18E-10	4,32
2A8-14	LC_Y48F	2,64E+06	3,00E-03	1,14E-09	1,97
2A8-15	LC_D91K	4,33E+06	2,09E-03	4,82E-10	4,64
2A8-16	LC_D91L	4,41E+06	4,40E-03	9,99E-10	2,24
2A8-17	LC_D91W	3,86E+06	4,32E-03	1,12E-09	2,00
2A8-20	2A8wt	3,13E+06	7,00E-03	2,24E-09	1,00
4B7HcD62R	HC_D62R	2,83E+06	1,65E-04	5,82E-11	190,83
4B7	4B7wt	7,56E+05	8,40E-03	1,11E-08	1,00

5

Tabla 6. Afinidad de variantes 2A8 y 4B7 seleccionadas (mutación simple) en TFPI de ratón

Muestra	Clon	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Mejora
2A8-1	HC_G33P	9,12E+05	1,45E-03	1,59E-09	2,21
2A8-2	HC_S31P	1,53E+06	3,16E-03	2,06E-09	1,71
2A8-3	HC_S31V	3,39E+06	2,02E-03	5,95E-10	5,91
2A8-4	HC_S35D	1,25E+06	2,46E-03	1,98E-09	1,78
2A8-7	HC_S54F	8,84E+05	1,83E-03	2,07E-09	1,69
2A8-9	HC_K99L	1,56E+06	7,59E-04	4,88E-10	7,20
2A8-17	LC_D91W	2,86E+06	2,32E-03	8,14E-10	4,32
2A8wt	2A8wt	1,47E+06	5,17E-03	3,51E-09	1,00
4B7HcD62R	HC_D62R	8,58E+06	3,67E-03	4,27E-10	137,00
4B7wt	4B7wt	2,18E+06	1,28E-01	5,86E-08	1,00

A continuación se investigó la afinidad de unión de varias mutaciones dentro de 2A8 y 4B7. Tal como se muestra en la Tabla 7 (a) y en la Tabla 8(a), los mutantes de 2A8 que contienen múltiples mutaciones en dominios CDR tienen una afinidad más alta que 2A8 de una sola mutación en la unión tanto con TFPI humano como con TFPI de ratón. Por ejemplo, 2A8-200 tiene una afinidad 53,7 veces más alta que 2A8 en la unión con TFPI humano y una afinidad 55,4 veces más alta en la unión con TFPI de ratón. Tal como se muestra en la Tabla 7(b) y la Tabla 8(b), los mutantes de 4B7 que contienen múltiples mutaciones en dominios CDR tienen una afinidad más alta que 4B7 de una sola mutación en la unión tanto con TFPI humano como con TFPI de ratón. Las variantes de las secuencias de 2A8 y 4B7 parentales proporcionadas en las Tablas 7 y 8 se proporcionan también en el listado de secuencias. Las

10

15

SEQ ID NO: 5-11 corresponden a variantes de cadena pesada de 2A8 enumeradas en la Tabla 7 y 8. Las SEQ ID NO: 12-18 corresponden a las variantes de cadena ligera de 2A8. Las SEQ ID NO: 19-26 corresponden a las variantes de 4B7 de cadena pesada enumeradas en las Tablas 7 y 8. Las SEQ ID NO: 27-34 corresponden a las variantes de 4B7 de cadena ligera.

5 Tabla 7(a). Afinidad de variantes 2A8 seleccionadas (mutaciones múltiples) de TFPI humano

Muestras	2A8 HC								2A8 LC																ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Mejora KD
	Q1	R30	S31	S35	151	S55	S56	K99	D1	I2	A13	S21	R28	N29	Y48	N51	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	V96				
2A8-127				D				L							F	V	D							W	1,68E+06	1,41E-04	8,41E-11	22
2A8-143				D		R		L							F	V				L				W	2,88E+06	1,05E-04	3,64E-11	50,9
2A8-200				D		R		L							F	V				W					2,87E+06	9,88E-05	3,44E-11	53,7
2A8-216			V		D	R		V							F					L				W	3,29E+06	1,54E-04	4,67E-11	39,6
2A8-227				D				L							F					L				W	3,28E+06	1,23E-04	3,75E-11	49,4
2A8-g200	E	S		D		R	G	L	S	Y	S	T	P	K	F	V		M	A	W	S	S	T		6,17E+05	3,61E-05	5,84E-11	31,7
2A8-g216			V		D	R		V	S	Y	S	T	P	K	F	S		M		L	S		T	W	1,45E+06	5,29E-05	3,65E-11	50,7
2A8 wt																									2,05E+06	3,80E-03	1,85E-09	1

Tabla 7(b). Afinidad de variantes 4B7 seleccionadas (mutaciones múltiples) en TFPI humano

Muestras	4B7 HC						4B7 LC					ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Mejora KD
	Q1	N32	G44	K55	D62	Y112	F31	S32	D33	N35	D97				
B18.5		D			Q	D	I		F	I		1,23E+06	3,18E-05	2,60E-11	428,2
B2.0		D			R	D		R	F	I	T	7,46E+06	3,81E-05	5,10E-12	2177,8
B27.1		D			R	D				T	T	2,78E+06	3,53E-05	1,27E-11	874,9
B32.5					R	D			F	I		2,15E+06	3,19E-05	1,48E-11	748,7
B41.2		D			R	D		R	F	I		3,46E+06	2,47E-05	7,16E-12	1552,7
B9.7		D			R	D		R		I		2,97E+06	2,61E-05	8,78E-12	1266,2
gB9.7	E	D	S	Y	R	D		R		I		9,38E+05	9,55E-06	1,02E-11	1091,5
gB9.7-IgG		D	S	Y	R	D		R		I		2,03E+06	1,56E-05	7,65E-12	1450,9
4B7												7,56E+05	8,40E-03	1,11E-08	1

Tabla 8(a). Afinidad de variante 2A8 seleccionadas (mutaciones múltiples) de ratón TFPI

Muestras	2A8 HC 2A8 LC																								ka(1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Mejora KD
	Q1	R30	S31	S35	151	S55	S56	K99	D1	I2	A13	S21	R28	N29	Y48	N51	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	V96				
2A8-127				D				L							F	V	D							W	8,24E+05	1,47E-03	1,78E-10	18,5
2A8-143				D		R		L							F	V				L				W	1,40E+06	1,25E-03	6,78E-11	48,5
2A8-200				D		R		L							F	V				W					1,04E+06	6,19E-04	5,94E-11	55,4
2A8-216			V		D	R		V							F					L				W	4,19E+06	2,16E-04	5,15E-11	63,9
2A8-227				D				L							F					L				W	6,91E+06	1,06E-03	1,53E-10	21,4
2A8-g200	E	S		D		R	G	L	S	Y	S	T	P	K	F	V		M	A	W	S	S	T		1,15E+06	1,39E-04	1,21E-10	27,3
2A8-g216			V		D	R		V	S	Y	S	T	P	K	F	S		M		L	S		T	W	9,84E+05	7,78E-05	7,91E-11	41,6
2A8 wt																									9,40E+05	3,10E-03	3,29E-09	1

Tabla 8(b). Afinidad de variante 4B7 seleccionadas (mutaciones múltiples) de ratón TFPI

Muestras	4B7 HG						4B7 LG					ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Mejora KD
	Q1	N32	G44	K55	D62	Y112	F31	S32	D33	N35	D97				
B18.5		D			Q	D	I		F	I		1,09E+06	4,30E-04	3,95E-10	138,7
B2.0		D			R	D		R	F	I	T	6,99E+06	3,15E-04	4,51E-11	1213,5
B27.1		D			R	D				T	T	4,06E+06	7,42E-04	1,83E-10	299,3
B32.5					R	D			F	I		4,52E+06	4,68E-04	1,04E-10	528,4
B41.2		D			R	D		R	F	I		4,73E+06	2,45E-04	5,19E-11	1055,7
B9.7		D			R	D		R		I		3,59E+06	3,34E-04	9,31E-11	588,2
qB9.7	E	D	S	Y	R	D		R		I		9,29E+05	1,85E-04	1,99E-10	275,4
gB9.7-IgG		D	S	Y	R	D		R		I		2,70E+06	2,36E-05	8,75E-12	6251,4
4B7												3,15E+06	1,72E-01	5,47E-08	1

5 Ejemplo 6. Los anticuerpos con una mejor afinidad presentaron más potencia para restaurar la actividad de FXa

Para determinar si los anticuerpos anti-TFPI con mejor afinidad mejoraron también la potencia para restaurar la actividad FXa bloqueando el efecto inhibitor de la proteína TFPI, los autores de la invención realizaron un ensayo de restauración de FXa. En este ensayo, se incubaron las distintas cantidades indicadas de cada uno de los anticuerpos con mejor afinidad (30 µl) con la cantidad fija de TFPI recombinante humano, de ratón o de rata (20 µl, 6,6 nM) en una mezcla de reacción total de 50 µl durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadieron 50 µl de FXa (3,39 nM) a la mezcla de reacción y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se añadieron 20 µl de sustrato de FXa Spectrozyme a la mezcla de reacción. Tras la incubación de 12 min, se hizo la lectura de la absorbancia de cada pocillo a 405 nm utilizando un lector de placa (Molecular Device). Para cada experimento, se obtuvo una curva normal lineal de la misma cantidad de FXa (3,39 nM) inhibida por cantidades conocidas de TFPI. Se definió 100 % de actividad de FXa restaurada como la actividad de FXa sin adición de ninguna cantidad de TFPI y se definió 0 % de actividad como la actividad de FXa en presencia de proteína TFPI (6,6 nM). De este modo se calculó concentración inhibidora máxima media (IC50) para cada anticuerpo anti-TFPI individual, algunos de los cuales se proporcionan en la Tabla 9. Se calculó también la concentración efectiva máxima media (EC50) para una segunda ronda de variantes 2A8 y se proporciona en la Tabla 10.

Tabla 9. IC50 y mejora de la potencia para anticuerpos anti-TFPI seleccionados con sustituciones de aminoácido simples utilizando un ensayo de restauración de FXa en comparación con sus anticuerpos parentales, 2A8 y 4B7, respectivamente

Muestra	Clon	IC50 (µg/ml)	Mejora
2A8-2	HC_S31P	0,33	1,7
2A8-3	HC_831V	0,201	3,5
2A8-4	HC_S35D	0,55	1,1
2A8-6	HC_I51E	0,76	0,9
2A8-7	HC_S54F	0,35	2,0
2A8-9	HC_K99L	0,181	3,9
2A8-10	HC_K99V	0,39	1,6
2A8-14	LC_Y48F	0,34	1,9
2A8-15	LC_D91K	0,34	1,9
2A8-16	LC_D91L	0,37	1,7
2A8-17	LC_D91W	0,23	3,0
2A8-20	2A8wt	0,70	1,0
4B7HcD62R	HC_D62R	0,058	25
4B7	4B7wt	1,46	1,0

Tabla 10. EC50 y mejora para anticuerpos anti-TFPI seleccionados que tienen múltiples sustituciones de aminoácido, en comparación con 2A8 parental.

Muestras	2A8 HC				2A8 LC					EC50 (nM)	Mejora	
	S31	S35	I51	S55	K99	Y48	N51	G56	D91			V96
2A8-127		D			L	F	V	D		W	0,44	18,2
2A8-143		D		R	L	F	V		L	W	0,50	15,8
2A8-200		D		R	L	F	V		W		0,81	9,7
2A8-216	V		D	R	V	F			L	W	1,08	7,3
2A8-9					L						1,00	7,9
2A8 wt											7,91	1,00

Ejemplo 7. Los anticuerpos con mejor afinidad presentaron una mayor potencia al acortar el tiempo de coagulación en un ensayo dPT

Para confirmar si estos anticuerpos con mejor afinidad mejoraban también la potencia para acortar el tiempo de coagulación, se llevó a cabo un ensayo de dPT para determinar el efecto de anticuerpos madurados con afinidad seleccionados sobre el tiempo de coagulación utilizando plasma con hemofilia A humano. El ensayo dPT se realiza esencialmente tal como describen Welsch y col. (Thrombosis Res., 1991, 64(2): 213-222). Brevemente, se prepara plasma con hemofilia A humano (George King Biomedical) mezclando plasma con 0,1 volúmenes de tampón de control (un control negativo) o los anticuerpos anti-TFPI indicados. Tras la incubación durante 30 minutos a 25 °C, se combinó cada una de las muestras preparadas (100 µl) con 100 µl de Simplastin (Biometieux) diluido apropiadamente (1:500 dilución) como fuente de tromboplastina y 100 µl de 25 mM cloruro de calcio. Se determina el tiempo de coagulación utilizando un fibrómetro STA4 (Stago) inmediatamente después de la adición de cloruro de calcio.

Ejemplo 8. Los anticuerpos con mejor afinidad presentaron una mayor potencia para acortar el tiempo de coagulación de sangre completa utilizando sangre con hemofilia A humana inducida por anticuerpo anti-Factor VIII

Para confirmar si los anticuerpos con mejor afinidad presentaban una mayor potencia para acortar el tiempo de coagulación, los autores de la invención utilizaron un sistema ROTEM para determinar el efecto de estos anticuerpos sobre el tiempo de coagulación en sangre con hemofilia A inducida por anticuerpo neutralizante de FVIII humana, que imita la sangre de pacientes con hemofilia A con inhibidores. El sistema ROTEM (Pentapharm GmbH) incluye un instrumento de cuatro canales, un ordenador, patrones de plasma, activadores y cubetas y pasadores desechables. Los parámetros tromboelastográficos de los sistemas de hemostasia de ROTEM incluyen: tiempo de coagulación (CT), que refleja el tiempo de reacción (el tiempo necesario para obtener una amplitud de 2 mm tras la iniciación de la recogida de datos) para que se inicie la coagulación de la sangre; tiempo de formación de coágulo (CFT) y ángulo alfa para reflejar la propagación de la coagulación y la amplitud máxima y el módulo elástico máximo para reflejar firmeza de coágulo. En un ensayo ROTEM, se utilizaron 300 µl de sangre completa recién extraída citrada en la que se neutralizó la actividad de FVIII por adición de anticuerpos policlonales contra FVIII, para determinar el efecto de anticuerpos anti-TFPI de mejor afinidad en comparación con los anticuerpos anti-TFPI parentales. Todos los constituyentes fueron reconstituidos y mezclados de acuerdo con las instrucciones del fabricante recogiendo los datos durante el período de tiempo requerido para cada sistema. Brevemente, se mezclaron las muestras por retirada/dispensa de 300 µl de sangre o de plasma con una pipeta automática en cubetas ROTEM, añadiendo 20 µl de CaCl₂ (200 mmoles), y seguido inmediatamente del mezclado de la muestra y la iniciación de la recogida de datos. Se recogieron datos durante 2 horas utilizando un sistema ROTEM controlado por ordenador (software versión 2.96).

En las Fig. 2 y 3, se muestra un ejemplo de los resultados del ensayo ROTEM en la detección del efecto de anticuerpos anti-TFPI de mejor afinidad en acortar los tiempos de coagulación de la sangre. En la Fig. 2 se muestra el efecto de anticuerpos anti TFPI madurados de afinidad de primera ronda seleccionados en el tiempo de coagulación de sangre con hemofilia inducida por anticuerpo humano. Los anticuerpos con mucha mejor afinidad 2A8-9 y 2A8-17 presentan mucha mejor potencia para acortar el tiempo de coagulación en sangre con hemofilia A inducida por anticuerpo humano, mientras que 2A8-10, cuya afinidad de unión para TFPI no mejoró, permaneció con una potencia de coagulación similar, en comparación con el anticuerpo 2A8 parental.

Ejemplo 9. Los anticuerpos con mejor afinidad presentan una tasa de supervivencia mejor en modelo de transección de vena caudal de ratones con hemofilia A

Para determinar si los anticuerpos con mejor afinidad son más potentes en cuanto a su efecto protector en ratones con hemorragia, se utilizó un modelo de transección de vena de la vena caudal de ratones con hemofilia A. Se administró a los ratones a través de la vena caudal una infusión con las distintas cantidades indicadas de anticuerpo 2A8 anti-TFPI parental o las distintas cantidades indicadas de A200, 24 horas antes de la lesión. Transcurridas 24 horas desde la administración de la dosis, se transfirió la vena izquierda de la cola a 2,7 mm desde la punta (en diámetro). Se observó la supervivencia al cabo de 24 horas tras la transección. Se demostró que la tasa de supervivencia era dependiente de la dosis cuando se administró con FVIII recombinante (10 IU/kg a 30 IU/kg).

La Figura 4 demuestra que un anticuerpo con mejor afinidad seleccionado A200 prolongó significativamente la supervivencia de ratones con hemofilia A dependiendo de la dosis en comparación con ratón IgG1 de control (CTX IgG1) y desplegó una mejor tasa de supervivencia que el anticuerpo 2A8 parental a cada una de las dosis equivalente.

Ejemplo 10. Los anticuerpos con mejor afinidad presentaron una mejor coagulación utilizando plasma de hemofilia C humano (FXI deficiente).

Asimismo, se utilizó un ensayo ROTEM para determinar el efecto de los anticuerpos en el tiempo de coagulación en plasma deficiente en factor XI humano (FXI-deficiente) que imita al de pacientes con hemofilia C. En la Figura 5 se presenta resultado de este ensayo ROTEM en detectar el efecto de los anticuerpos anti-TFPI con mejor afinidad en

acortar el tiempo de coagulación de plasma. La Figura 5 demuestra que una variante de 2A8, 2A8-200, potenció la coagulación en plasma con hemofilia C humana dependiendo de la dosis y sus efectos son comparables con los de FVIIa recombinante.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Bayer HealthCare LLC
	<120> Anticuerpos monoclonales optimizados contra el Inhibidor de la Ruta del Factor Tisular (TFPI)
10	<130> BHC 10 5 001 PCT
	<160> 34
	<170> PatentIn versión 3.5
15	<210> 1
	<211> 117
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
20	<400> 1
	Gln 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 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 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Lys Tyr Arg Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110 Val Thr Val Ser Ser 115
25	<210> 2
	<211> 108
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
30	<400> 2

ES 2 765 418 T3

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
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	100	105						

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

5

ES 2 765 418 T3

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	Asp	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	
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					
		115					120								

<210> 4
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 4

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

Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr

<210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 5

Gln 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 Arg 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 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 2 765 418 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
115

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 6

Gln 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 Arg 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 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

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
115

<210> 7
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 7

ES 2 765 418 T3

Gln 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 Arg 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 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

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
115

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 8

ES 2 765 418 T3

Gln	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	Arg	Val	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	Asp	Arg	Gly	Ser	Arg	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		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Val	Tyr	Arg	Tyr	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser												
		115														

<210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante

<400> 9

ES 2 765 418 T3

Gln 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 Arg 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 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

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
115

<210> 10
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 10

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

ES 2 765 418 T3

	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
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr					
	65		70		75
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					
	115				

<210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante

<400> 11

ES 2 765 418 T3

Gln 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 Arg Val 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 Asp Arg Gly Ser Arg 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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 12

ES 2 765 418 T3

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 Phe
35 40 45

Tyr Asp Val Asn Arg Pro Ser Asp 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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 13

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 Phe
35 40 45

Tyr Asp Val Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

ES 2 765 418 T3

50

55

60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 14

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 Phe
35 40 45

Tyr Asp Val 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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 15

ES 2 765 418 T3

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	Phe
		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
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Trp	Leu	Asp	Gly	Val	Pro	Trp
				85					90					95	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln				
			100					105							

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante

<400> 16

ES 2 765 418 T3

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 Phe
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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 17

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

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
100 105

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 18

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 Ser 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 Met
65 70 75 80

ES 2 765 418 T3

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 19
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 19

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 Gly Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Gln 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

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
115 120

<210> 20
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 20

ES 2 765 418 T3

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	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	
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					
		115					120								

<210> 21
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante

<400> 21

ES 2 765 418 T3

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 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

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
115 120

<210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 22

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

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
115 120

<210> 23
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 23

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

ES 2 765 418 T3

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

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
115 120

<210> 24
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 24

ES 2 765 418 T3

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	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	
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	115	120							

<210> 25
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante

<400> 25

ES 2 765 418 T3

Glu 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

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
115 120

<210> 26
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 26

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

ES 2 765 418 T3

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

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
115 120

<210> 27
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 27

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 Ile Ser
20 25 30

Phe 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

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

<210> 28
<211> 114

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Variante

<400> 28

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

Phe 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

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

Thr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr

10 <210> 29
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Variante

20 <400> 29

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 Thr 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

Thr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr

<210> 30
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 30

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

Phe 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

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

<210> 31
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 31

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

Phe 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

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

<210> 32
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 32

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

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

<210> 33
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 33

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

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

<210> 34
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante

<400> 34

ES 2 765 418 T3

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

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

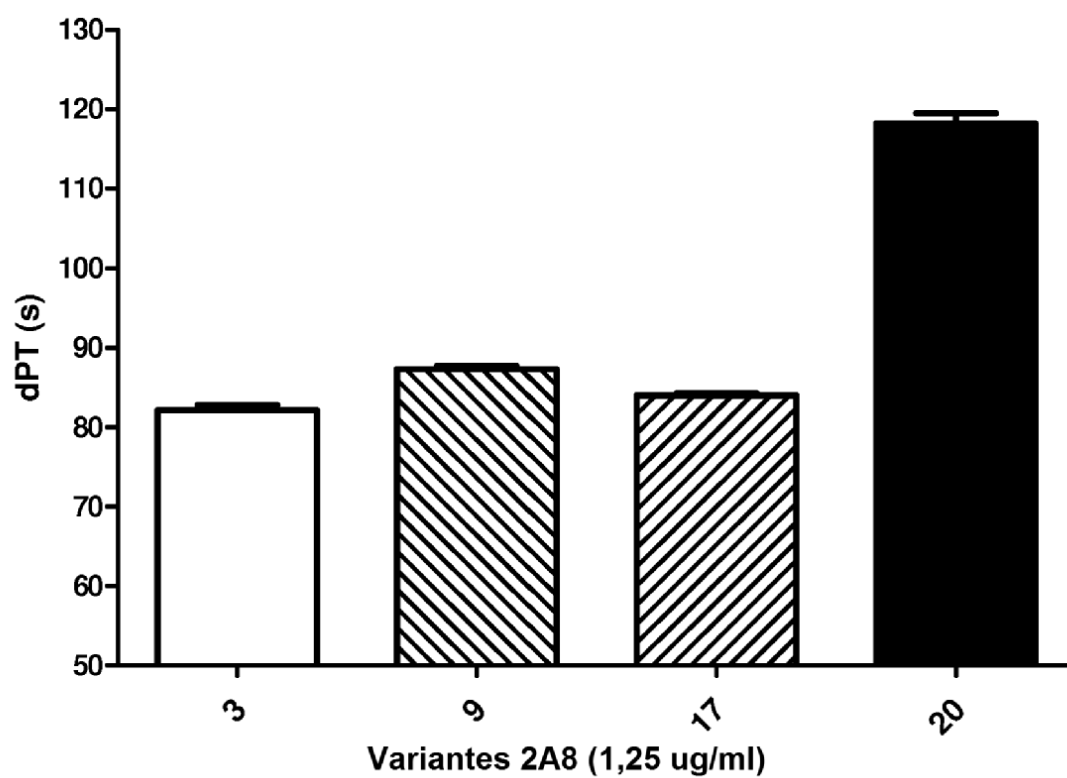
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IgG monoclonal humano que se une específicamente a un inhibidor de la ruta del factor tisular humano, en el que el

- 5 a) la cadena pesada humana comprende SEQ ID NO: 10 y
 b) la cadena ligera humana comprende SEQ ID NO: 17.

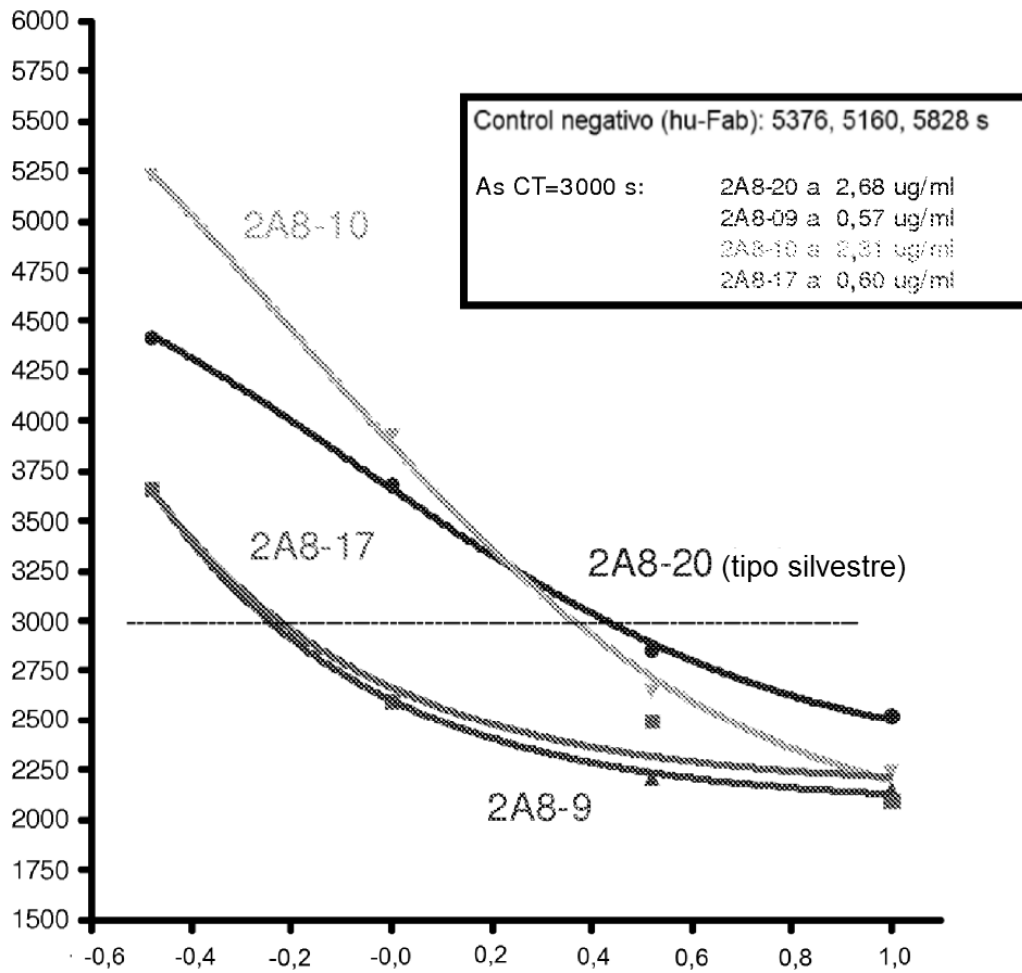
2. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo IgG monoclonal humano de la reivindicación 1.

Figura 1



Número	Clon	Muestra
3	HC_S31V	2A8-3
9	HC_K99L	2A8-9
17	LC_D91W	2A8-17
20	Tipo silvestre	2A8

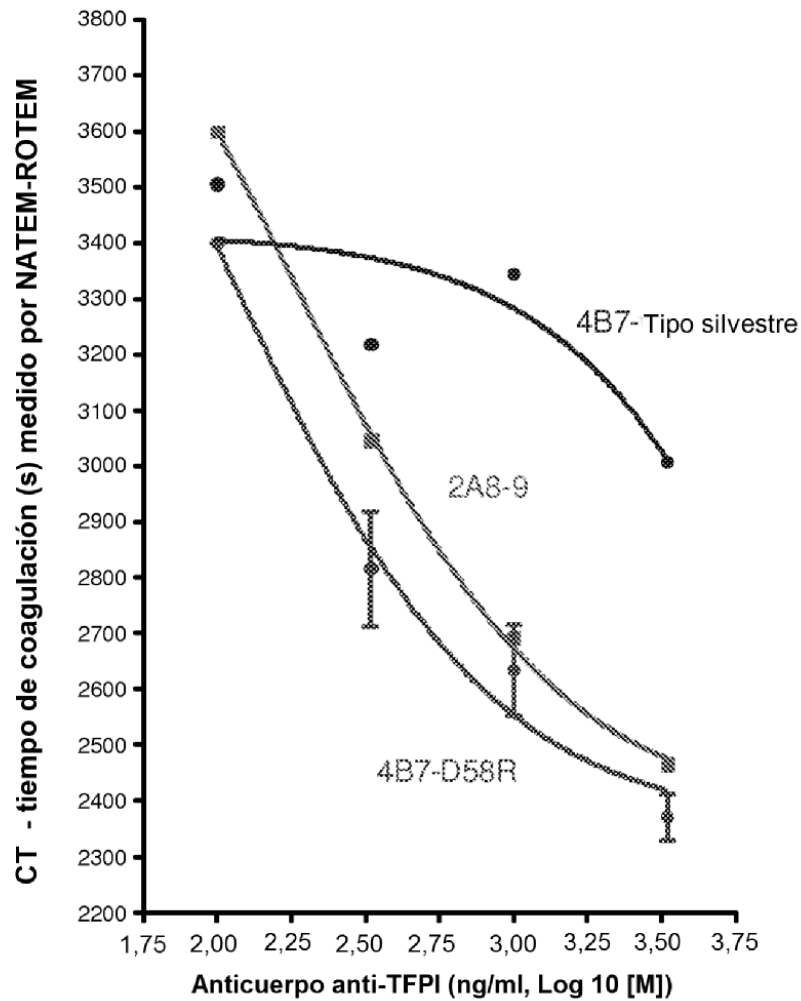
Figura 2



Número	Clon	Muestra
9	HC_K99L	2A8-9
10	HC_K99V	
17	LC_D91W	2A8-17
20	Tipo silvestre	2A8

Figura 3

**Actividad de coagulación de anticuerpo anti-TFPI
en sangre completa de ratón Hem-A**
agrupación de sangre completa de ratón con Hem-A de sangrado de la vena cava D.Z
NATEM-ROTEM 18-09.8



Muestra	Clon
2A8-9	HC_K99L
4B7-D58R	HC_D62R
4B7	Tipo silvestre 4B7

Figura 4

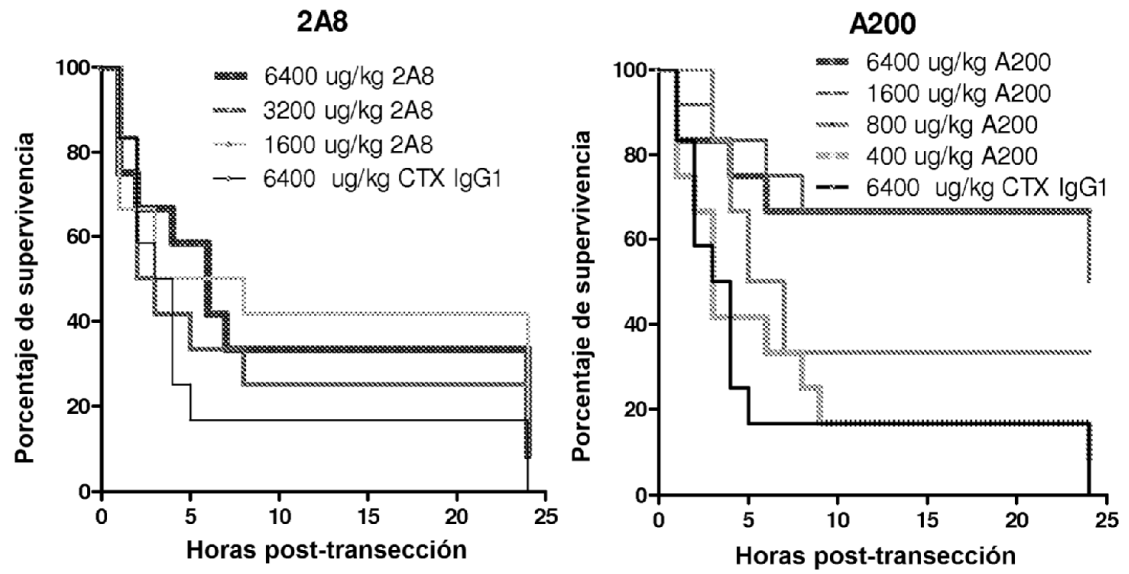


Figura 5

