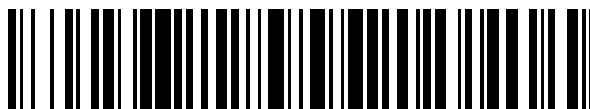


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 842**

51 Int. Cl.:

C07K 16/38 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2015** **PCT/EP2015/052624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015** **WO15118147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2015** **E 15706386 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020** **EP 3102610**

54 Título: **Objetivo dual de TAFI y PAI-1**

30 Prioridad:

07.02.2014 US 201461937323 P
19.03.2014 GB 201404879
19.03.2014 GB 201404880
04.07.2014 GB 201411979
18.12.2014 GB 201422609

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2020

73 Titular/es:

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (25.0%)
K.U. Leuven R&D Waaistraat 6 Box 5105
3000 Leuven, BE;
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%);
UNIVERSITÉ DE CAEN BASSE NORMANDIE
(25.0%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
CAEN (25.0%)

72 Inventor/es:

DECLERCK, PAUL;
DE MEYER, SIMON;
GEUKENS, NICK;
GILS, ANN;
RUBIO, MARINA;
VIVIEN, DENIS y
WYSEURE, TINE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 784 842 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

Objetivo dual de TAFI y PAI-1

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al tratamiento y la prevención de trastornos tromboticos como accidente cerebrovascular y tromboembolismo mediante inhibición dual del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y del inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI). La inhibición dual puede estar mediada por un derivado de anticuerpo biespecífico que se une a ambas dianas.

Antecedentes

Después de un accidente cardiovascular agudo, el único tratamiento actualmente disponible para recanalizar un vaso sanguíneo ocluido es la administración sistémica de una dosis alta de activadores de plasminógeno. Si bien son eficaces cuando se administran poco después del evento, los activadores de plasminógeno plasmáticos también causan efectos secundarios debilitantes como hemorragia intracraneal y neurotoxicidad. Además, no está garantizada la restauración satisfactoria del flujo sanguíneo debido a la baja recanalización y a las altas tasas de reoclusión incluso cuando se administran altas dosis de activadores de plasminógeno [Saver JL. y cols. (2011) *J. Thromb Haemost.* 9 Supl. 1, 333-343]. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de tratamientos eficaces de los vasos sanguíneos ocluidos, por ejemplo, promoviendo la fibrinolisis o la trombolisis.

Una de las causas del fallo trombolítico es la presencia de inhibidores circulantes de la fibrinolisis, como el inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI) y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) [Fernández-Cadenas I y cols. (2007) *J. Thromb Haemost.* 5, 1862-1868]. Ambas moléculas ralentizan la velocidad de formación de plasmina mediada por el activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA), la enzima clave de la fibrinolisis, aunque a través de mecanismos distintos (como se revisó en Rijken DC & Lijnen HR (2009) *J Thomb Haemost.* 7, 4-13).

TAFI, una pro-enzima de 56 kDa con un nivel plasmático de 4-15 μ g/ml, se puede activar a TAFIa por la trombina, sola o en complejo con la trombomodulina o la plasmina. A través de su actividad carboxipeptidasa, TAFIa es capaz de escindir los residuos C-terminales de Lys expuestos en la fibrina parcialmente degradada que actúan como una función de cofactor en la activación del plasminógeno a plasmina mediada por tPA. El PAI-1 (glicoproteína de 45 kDa con un nivel en plasma de 5-50 ng/ml y una concentración dentro de las plaquetas de 200 ng/ml) es el inhibidor principal del tPA y pertenece a la superfamilia de los inhibidores de las serín proteasas (serpina). La forma activa de PAI-1 puede neutralizar irreversiblemente la actividad de tPA formando un complejo covalente de estequiometría 1:1, acompañado por la deformación de la triada catalítica de la serín proteasa.

Dadas sus funciones complementarias en la inhibición de la fibrinolisis, un enfoque para promover la fibrinolisis es la inhibición dual de TAFI y de PAI-1. Se ha intentado en varios estudios la candidatura simultánea de TAFI y de PAI-1. Sin embargo, los resultados no indicaron de manera consistente que la inhibición dual de TAFI y de PAI-1 mejorara la trombolisis en comparación con la inhibición individual. En un estudio, se caracterizaron las funciones complementarias de TAFI y de PAI-1, así como de una tercera molécula α_2 -AP, en ensayos de trombolisis inducidos por tPA en presencia o ausencia de inhibidores de TAFI, PAI-1 y/o α_2 -AP [Mutch NJ. y cols. (2007) *J Thromb Haemost.* 5, 812-817]. Dependiendo del tipo de trombo, los ensayos indicaron un papel para las tres moléculas o una contribución sustancial de α_2 -AP y de TAFI, con una menor contribución de PAI-1. De manera similar, los estudios en ratones *knockout* sencillos y dobles sugirieron que los efectos tromboticos en ciertos ensayos se debían a la inhibición de TAFI más que a la de PAI-1 [Vercauteren E. y cols. (2012) *J Thromb Haemost.* 10, 2555-2562].

Cabe destacar que ha demostrado ser prometedora una estrategia de doble objetivo basada en derivados de anticuerpos biespecíficos (diacuerpos). El diacuerpo T12D11x33H1F7, basado en anticuerpos monoclonales que se unen a TAFI y a PAI-1, se demostró que tenía un efecto estimulador sobre la fibrinolisis que excedía el efecto observado cuando se probaron sus componentes de anticuerpos monoclonales (MA) por separado. Además, los nuevos anticuerpos monoclonales frente a TAFI y PAI-1 exhiben características únicas. Tanto el MA-RT36A3F5 como el MA-TCK26D6 inhiben el TAFI de ratón y de rata, y cada MA actúa a través de mecanismos distintos: el primero desestabiliza TAFIa mientras que el segundo altera la activación de TAFI mediada por plasmina y también interfiere con la interacción de TAFIa sobre la fibrina [Hillmayer K. y cols. (2008) *J Thromb Haemost.* 6, 1892-1899; Vercauteren E. y cols (2011) *Blood* 117, 4615-4622; Semeraro F. y cols. (2013) *J Thromb Haemost.* 11, 2137-2147]. Vercauteren E. y cols. (2011) describen la evaluación de las propiedades pro-fibrinolíticas del anticuerpo monoclonal anti-TAFI MA-TCK26D6 en un modelo de ratón de tromboembolismo. El MA-33H1F7 y el MA-MP2D2 inhiben la PAI-1 de ratón y de rata convirtiendo la forma activa en una forma de sustrato de PAI-1 que se escinde por tPA [Debrock S. & Declerck PJ. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1337, 257-266; Van De Craen B. y cols. (2011) *Thromb Res.* 128, 68-76]. Los estudios *in vivo* han mostrado un efecto beneficioso de los anticuerpos anteriormente mencionados sobre la tasa de supervivencia y parálisis en ratones después del desafío tromboembólico [Vercauteren (2011) citado anteriormente, Van De Craen citado anteriormente]. Recientemente, los anticuerpos MA-33H1F7 y MA-TCK26D6 que reconocen específicamente los antígenos humanos correspondientes se adaptaron para hacer el derivado de anticuerpo biespecífico Db-TCK26D6x33H1F7 y se demostró un fuerte efecto pro-fibrinolítico del anticuerpo *in vitro* [Wyseure T. y cols. (2013) *J Thromb Haemost.* 11, 2069-2071].

El Db-TCK26D6x33H1F7 constituye un agente pro-fibrinolítico fuerte y robusto que se puede evaluar más a fondo en modelos de enfermedad de ratón a los que contribuyen TAFI y PAI-1 y que se pueden usar finalmente en un entorno clínico. Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio de doble objetivo ha demostrado de manera concluyente un papel para los inhibidores o diacuerpos en el tratamiento de trastornos trombóticos específicos *in vivo*. Además, ningún estudio ha proporcionado evidencia de tratamientos viables para trastornos trombóticos basados en inhibidores de fibrinolisis o trombolisis como alternativas a los activadores de plasminógeno.

Sumario de la invención

Se describe en esta memoria el diacuerpo Db-TCK26D6x33H1F7 para usar en el tratamiento de trastornos trombóticos, como accidente cerebrovascular y tromboembolismo. El Db-TCK26D6x33H1F7 se puede administrar antes o después del inicio del trastorno trombótico y, además, se puede administrar en presencia o ausencia de activadores del plasminógeno como tPA.

La presente descripción se refiere a un derivado de anticuerpo biespecífico para usar en el tratamiento de un trastorno trombótico agudo en un paciente, que comprende un primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idénticas a cada una de CDR1H de SEQ ID N°: 1; CDR2H de SEQ ID N°: 2; CDR3H de SEQ ID N°: 3; CDR1L de SEQ ID N°: 4; CDR2L de SEQ ID N°: 5 y CDR3L de SEQ ID N°: 6; y un segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idéntica a cada una de CDR1H de SEQ ID N°: 7, CDR2H de SEQ ID N°: 8; CDR3H de SEQ ID N°: 9; CDR1L de SEQ ID N°: 10; CDR2L de SEQ ID N°: 11 y CDR3L de SEQ ID N°: 12, en donde el derivado de anticuerpo biespecífico se administra después del inicio del trastorno trombótico agudo.

En algunas realizaciones de la invención reivindicada, las secuencias de aminoácidos en los derivados de anticuerpos biespecíficos son al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% idénticas a las secuencias de aminoácidos descritas en las SEQ ID N°: 1-18. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico es para usar en un trastorno trombótico agudo que es al menos de accidente cerebrovascular isquémico (AIS), oclusión de la arteria cerebral media (MCAo), tromboembolismo, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio (IM), embolismo pulmonar, enfermedad arterial periférica, trombosis hepática y/o renal o bloqueo de catéter. Por ejemplo, el trastorno trombótico agudo puede ser AIS. El trastorno trombótico agudo puede ser MCAo.

En ciertas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra entre 0-15 horas después del inicio de los síntomas del trastorno trombótico agudo. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra hasta 3 horas después del inicio de los síntomas del trastorno trombótico agudo. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra hasta 4,5 horas después del inicio de los síntomas del trastorno trombótico agudo. En algunos casos, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra hasta 12 horas después del inicio de los síntomas del trastorno trombótico agudo. El derivado de anticuerpo biespecífico se puede administrar sin tPA. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se puede administrar sin tPA. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra sin tPA durante un periodo de tiempo de hasta 90 minutos después del inicio del trastorno trombótico agudo, por ejemplo, 0-90 minutos después del inicio.

En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra con tPA. Por ejemplo, el derivado de anticuerpo biespecífico se puede administrar 1 hora después de la administración de tPA.

En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico es para usar en un trastorno trombótico agudo que se caracteriza por la presencia de un coágulo de sangre rico en fibrina. El trastorno trombótico agudo se puede caracterizar por la presencia de un coágulo de sangre rico en fibrina. En ciertas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico está humanizado.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un derivado de anticuerpo biespecífico para usar en el tratamiento de un trastorno trombótico agudo en un paciente, que comprende un primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI) y comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 14; y un segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 16, en donde el derivado de anticuerpo biespecífico se administra después del inicio del trastorno trombótico agudo. En algunas realizaciones, un derivado de anticuerpo biespecífico para usar en el tratamiento de un trastorno trombótico agudo en un paciente, que comprende un primer dominio representado por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 17; y un segundo dominio representado por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 18, en donde el derivado de anticuerpo biespecífico se administra después del inicio del trastorno trombótico agudo.

Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un derivado de anticuerpo biespecífico para usar en el tratamiento de un trastorno trombótico agudo en un paciente, que comprende un primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idénticas a cada una de CDR1H de SEQ ID N°: 1; CDR2H de SEQ ID N°: 2; CDR3H de SEQ ID N°: 3; CDR1L de SEQ ID N°: 4; CDR2L de SEQ ID N°: 5 y CDR3L de SEQ ID N°: 6; y un segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idénticas a cada una de CDR1H de SEQ ID N°: 7, CDR2H de SEQ ID N°: 8; CDR3H de SEQ ID N°: 9; CDR1L de SEQ ID N°: 10; CDR2L de SEQ ID N°: 11 y CDR3L de SEQ ID N°: 12, en donde el derivado de anticuerpo biespecífico se administra después del inicio del trastorno trombótico agudo y se administra sin tPA. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra sin tPA y dentro de un periodo de tiempo que no es más de 90 minutos desde el inicio del trastorno trombótico agudo.

Un aspecto de la presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos para usar en el tratamiento y prevención de un trastorno trombótico agudo en un paciente. Tales anticuerpos comprenden un primer dominio objetivo que se une específicamente al inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°: 1 de CDR1H, SEQ ID N°: 2 de CDR2H, SEQ ID N°: 3 de CDR3H, SEQ ID N°: 4 de CDR1L, SEQ ID N°: 5 de CDR2L y SEQ ID N°: 6 de CDR3L; y un segundo dominio objetivo que se une específicamente al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por SEQ ID N°: 7 de CDR1H, SEQ ID N°: 8 de CDR2H, SEQ ID N°: 9 de CDR3H, SEQ ID N°: 10 de CDR1L, SEQ ID N°: 11 de CDR2L y SEQ ID N°: 12 de CDR3L.

Las realizaciones de esta memoria incluyen anticuerpos biespecíficos en los que el primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 14; y el segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 16.

Las realizaciones de esta memoria son anticuerpos biespecíficos que están humanizados.

En realizaciones específicas, estos anticuerpos biespecíficos son para usar en el tratamiento o prevención de lesiones cerebrales como resultado de un trastorno trombótico agudo.

En realizaciones específicas, el trastorno trombótico agudo se selecciona del grupo que consiste en, oclusión arterial periférica aguda, oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) y tromboembolismo como tromboembolismo venoso profundo y embolismo pulmonar. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son para usar en el tratamiento o prevención de un trastorno trombótico agudo en un paciente en un tratamiento combinado con tPA.

En otras realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son para usar en el tratamiento o prevención de un trastorno trombótico agudo en un paciente, donde el tratamiento se realiza sin la administración de tPA, antes, junto o después de la administración del anticuerpo biespecífico.

El trastorno trombótico agudo anteriormente mencionado está en una realización específica caracterizado por la presencia de un coágulo de sangre rico en plaquetas.

También se describen en esta memoria métodos para tratar o prevenir un trastorno trombótico agudo en un paciente, que comprende la etapa de administrar un anticuerpo biespecífico frente a TAFI y PAI. En esta memoria, el anticuerpo comprende un primer dominio objetivo que se une específicamente al inhibidor de fibrinolisis activable por trombina (TAFI) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°: 1 de CDR1H, SEQ ID N°: 2 de CDR2H, SEQ ID N°: 3 de CDR3H, SEQ ID N°: 4 de CDR1L, SEQ ID N°: 5 de CDR2L y SEQ ID N°: 6 de CDR3L; y un segundo dominio objetivo que se une específicamente al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por SEQ ID N°: 7 de CDR1H, SEQ ID N°: 8 de CDR2H, SEQ ID N°: 9 de CDR3H, SEQ ID N°: 10 de CDR1L, SEQ ID N°: 11 de CDR2L y SEQ ID N°: 12 de CDR3L.

Los usos médicos de la invención proporcionan varias ventajas en comparación con las terapias existentes.

Los usos médicos de la presente invención en donde se usa un diacuerpo frente a TAFI y PAI-1 tiene, en comparación con tPA, menos riesgos de causar hemorragia intracraneal y neurotoxicidad. Los diacuerpos como se describen en esta memoria son para usar en la reducción del tamaño de la lesión en pacientes que padecen una lesión cerebral. Las lesiones cerebrales pueden estar causadas por trastornos trombóticos, como accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico agudo (AIS) y/o oclusión de la arteria cerebral media (MCAo).

En comparación con el tPA que tiene una actividad corta tras la administración (aproximadamente 15 minutos), los diacuerpos se pueden unir a sus dianas durante un periodo de tiempo más largo.

Las altas dosis de tPA pueden dar como resultado una actividad enzimática no deseada de la plasmina. El uso de una alta dosis de diacuerpo es menos crítica. El anticuerpo que no une PAI-1 o TAFI no tiene efectos secundarios.

En comparación con tPA, los diacuerpos muestran una reducción en el tiempo de sangrado. Por consiguiente, los diacuerpos de la presente invención descritos en esta memoria tienen la propiedad ventajosa de reducir el riesgo de sangrado no deseado, como la hemorragia intracraneal.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los niveles de expresión de scFv con CDR injertado. A. Estructura modelada del CDR de MA-RT36A3F5 (círculos) en el armazón de scFv-4D5. B. Inmuno transferencia que muestra extractos periplásmicos que contienen scFv-RT36A3F5-4D5 con CDR injertado (carril 1), scFv-T12D11 como control (carril 2), scFv-RT36A3F5-T12D11 (carril 3) y scFv-RT36A3F5-4D5DM (carril 4), detectados a través de anticuerpo policlonal anti-cola de His.

La figura 2 muestra una representación esquemática de inhibidores biespecíficos: Db-RT36A3F5x33H1F7 (Db), Db-RT36A3F5-4D5x33H1F7 (Db con CDR injertado), scDb-33H1F7xRT36A3F5 (scDb) y scDb-33H1F7xRT36A3F5-4D5 (scDb con CDR injertado). PH: región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1; PL: región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1; TH: región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-TAFI; TL: región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-TAFI; TH': región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-TAFI humanizado; TL': región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-TAFI humanizado.

La figura 3 muestra la estabilidad plasmática y el efecto pro-fibrinolítico durante la lisis del coágulo *in vitro*. A. Gráfico que representa la estabilidad, determinada mediante un ensayo basado en ELISA para medir la capacidad de unión residual hacia TAFI y PAI-1 simultáneamente. Se incubaron variantes de (sc)Db (Db-RT36A3F5x33H1F7 (Db), Db-RT36A3F5-4D5x33H1F7 (Db con CDR injertado), scDb-33H1F7xRT36A3F5 (scDb) y scDb-33H1F7xRT36A3F5-4D5 (scDb con CDR injertado)) a 10 μ g/ml en plasma de rata con citrato a 37°C. El Db control era Db-T12D11x33H1F7. Se analizó una alícuota en los puntos de tiempo cero, 1 hora y 3 horas, y se expresó relativamente la proteína unida hacia el punto de tiempo cero (% de unión residual, media $\pm$ SEM, n= 3-9). B. Gráfico que representa la estabilidad (% de unión residual después de 3 horas a 37°C en plasma, media $\pm$ SEM, n= 3-9) *versus* propiedades pro-fibrinolíticas de variantes (sc)Db a un exceso molar de 8 veces sobre TAFI durante la lisis del coágulo en plasma de rata (expresado como lisis relativa (media $\pm$ SEM, n= 3) a la de MA-RT36A3F5 a un exceso molar de 4 veces sobre TAFI).

La figura 4 muestra el efecto pro-fibrinolítico del MA (adición individual o combinada de MA-TCK26D6 y MA-33H1F7) y Db-TCK26D6x33H1F7 durante mediciones tromboelastométricas usando sangre humana (A) y sangre de ratones endotoxémicos (B). Gráfico que representa (A) grado de lisis ($\square$ L45, %; media $\pm$ SEM, n= 6-12) y (B) $\square$ AUC relativa (media $\pm$ SEM, n= 3-6) en presencia de MA-33H1F7, MA-TCK26D6, la adición combinada de MA o diacuerpo. La significación estadística se indica mediante asteriscos (* p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001).

La figura 5 muestra una evaluación *in vivo* de MA en un modelo de tromboembolismo inducido por la administración sistémica de tromboplastina. Gráfico que representa el contenido de fibrina en los pulmones inyectados con solución salina, MA-TCK26D6 a 5 mg/kg o MA-33H1F7 a 1 mg/kg (media $\pm$ SEM, n= 5-7). Los niveles basales se obtuvieron aislando los pulmones de ratones sin desafío trombótico (media $\pm$ SEM, n= 5). La significación estadística se indica mediante asteriscos (* p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001).

La figura 6 muestra una evaluación *in vivo* de MA y Db en un modelo de tromboembolismo usando ratones endotoxémicos. Gráfico que representa el contenido de fibrina en pulmones de ratones endotoxémicos inyectados con (A.) vehículo, MA-33H1F7 a 10 mg/kg, MA-TCK26D6 a 5 mg/kg, MA-TCK26D6 a 5 mg/kg + MA-33H1F7 a 10 mg/kg o (B.) vehículo, MA-33H1F7 a 1 mg/kg, MA-TCK26D6 a 1 mg/kg, MA-TCK26D6 a 1 mg/kg + MA-33H1F7 a 1 mg/kg, Db-TCK26D6x33H1F7 a 0,8 mg/kg (media $\pm$ SEM, n= 5-10). Los niveles basales se obtuvieron aislando los pulmones de ratones sanos sin desafío trombótico (media $\pm$ SEM, n= 5). La significación estadística se indica en relación con el vehículo (* p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001).

La Figura 7 muestra la evaluación *in vivo* de MA en un modelo de ratón de MCAo mecánico transitorio. La Fig. 7A y 7D muestran el tamaño de la lesión (mm³), la Fig. 7B y 7E muestran la puntuación de Bederson (0-5), la Fig. 7C y 7F muestran la puntuación de la prueba de agarre (0-5), medidas 24 horas después de la oclusión en ratones tratados con vehículo (PBS), control negativo de IgG, MA-TCK26D6 a 6 mg/kg y MA-TCK26D6 a 25 mg/kg (Fig. 7A-7C, media $\pm$ SEM, n= 8-12) y vehículo (PBS), control negativo de IgG y MA-33H1F7 a 6 mg/kg (Fig. 7D-7F, media $\pm$ SEM, n= 14-16). La Fig. 7G muestra los contenidos de fibrinógeno en el lado ipsilateral del cerebro (veces de incremento *vs.* contralateral), medido a 24 horas después de la oclusión en ratones tratados con vehículo (PBS), control negativo de IgG, MA-33H1F7 a 6 mg/kg y MA-TCK26D6 a 25 mg/kg (media $\pm$ SEM, n= 4-5). La significancia estadística se indica de la siguiente manera: * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001. (el control MA es MA-T30E5).

La figura 8 muestra la evaluación *in vivo* de MA y Db en un modelo de ratón de MCAo mecánica transitoria. La Fig. 8A muestra el tamaño de la lesión (mm³), la Fig. 8B muestra la puntuación de Bederson (0-5), la Fig. 8C muestra la puntuación de la prueba de agarre (0-5) medida a 24 horas después de la oclusión en ratones tratados con vehículo (PBS), control negativo de IgG, MA-33H1F7 a 1 mg/kg, MA-TCK26D6 a 1 mg/kg, MA-TCK26D6 a 1 mg/kg + MA-33H1F7 a 1 mg/kg o Db a 0,8 mg/kg (media $\pm$ SEM, n= 10-12). La Fig. 8D muestra el contenido de fibrinógeno en el lado ipsilateral del cerebro (veces de incremento *vs.* contralateral), medido a 24 horas después de la oclusión en

ratones tratados con vehículo (PBS), control negativo de IgG, MA-TCK26D6 a 1 mg/kg + MA-33H1F7 a 1 mg/kg o Db a 0,8 mg/kg (media $\pm$ SEM, n= 3-4). La significancia estadística se indica de la siguiente manera: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (el control MA es MA-NB27B3).

La figura 9 muestra la evaluación *in vivo* del diacuerpo como tratamiento único o como adyuvantes al tratamiento trombolítico en un modelo de ratón de MCAo inducido por trombina. Los gráficos representan los siguientes parámetros medidos a las 24 horas después del inicio del coágulo en ratones tratados con PBS, tPA (10 mg/kg), diacuerpo (Db-TCK26D6x33H1F7) a 0,8 mg/kg y terapia de combinación (diacuerpo a 0,8 mg/kg + tPA a 10 mg/kg): (A) tamaño de lesión (mm^3) (B) puntuación angiográfica (0-2) y (C) % de reducción en el flujo sanguíneo cerebral (CBF) (media $\pm$ SEM, n= 6-8). La significancia estadística se indica en relación con el PBS (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Se presentan los puntos de tiempo adicionales después de la oclusión inducida por trombina en las Figs. 9D, 9E y 9F. El volumen de lesión (mm^3) a las 24 horas después de la oclusión (panel superior) e imágenes representativas ponderadas en T2 24 horas después de la oclusión (panel inferior) de ratones tratados con vehículo, tPA (10 mg/kg), Db (0,8 mg/kg) o una combinación de Db (0,8 mg/kg) y tPA (10 mg/kg) 20 minutos después de la oclusión (Fig. 9D, n= 6-8), 90 minutos después de la oclusión (Fig. 9E, n= 9-10) y 240 minutos después de la oclusión (Fig. 9F, n= 7-9). Las líneas punteadas delimitan las lesiones por accidente cerebrovascular. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns= no significativo. tPA indica activador de plasminógeno de tipo de tejido recombinante; Db, diacuerpo.

La figura 10 muestra la evaluación *in vivo* del diacuerpo en un modelo de ratón de MCAo inducida por FeCl_3 . Los gráficos representan (A) diferencia en el flujo sanguíneo cerebral (CBF) a 1 hora después de la oclusión (B) tamaño de lesión (mm^3) (C) puntuación angiográfica (0-2) y (D) % de reducción en el CBF a las 24 horas después de la oclusión, en ratones tratados con PBS, tPA a 10 mg/kg y diacuerpo (Db-TCK26D6x33H1F7) a 1,6 mg/kg y a 3,6 mg/kg (media $\pm$ SEM, n= 8-15). La significancia estadística se indica en relación con el PBS (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La figura 11 muestra la expresión *in vitro* e *in vivo* de scDBs frente a TAFI y PAI-1. Gráficos que comparan las siguientes propiedades de una serie de scDBs y sus variantes (A) producción *in vitro* expresada como proteína secretada en medio condicionado (B) estabilidad *in vitro* en plasma a 37°C hasta 72 horas, expresada como unión residual (%) y (C) expresión *in vivo* después de la inyección intramuscular de ADN y electroporación.

La figura 13 muestra la farmacocinética sistémica del diacuerpo después de la inyección intravenosa. El gráfico muestra los niveles plasmáticos (mg/ml, media $\pm$ SEM) representados frente al tiempo (min) después de la inyección IV del diacuerpo a 0,8 mg/kg en 6 ratones (las flechas rojas indican la vida media circulante= 121 min).

La figura 12 muestra el tiempo de sangrado de la cola y el sangrado acumulativo de hasta 60 min en ratones tratados con vehículo (PBS); tPA a 1 y 10 mg/kg; diacuerpo a 0,8 mg/kg y 3,6 mg/kg y Db (0,8 mg/kg) + tPA (10 mg/kg). Las Figs. 12A y 12B muestran el efecto de tPA y/o diacuerpo en el tiempo de sangrado y los niveles de hemoglobina. La Fig. 12A muestra el tiempo (en minutos) hasta el cese inicial del sangrado de la cola según se monitorizó en ratones, y (B) sangrado acumulativo (pérdida de hemoglobina) de hasta 60 min, medida como hemoglobina (g/dl) (media, n= 9-16 ratones/grupo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). tPA indica activador de plasminógeno de tipo de tejido recombinante; Db, diacuerpo.

La figura 14 muestra la evaluación del efecto del diacuerpo (Db) sobre la muerte neuronal cortical con o sin excitotoxicidad inducida por NMDA. En la Fig. 14A, las neuronas corticales se expusieron a NMDA (como una condición de muerte completa (FK); 500 mmol/l) o diacuerpo (0,5-50 mg/ml); en la Fig. 14B, las neuronas corticales se expusieron a NMDA (500 mmol/l (muerte completa, FK) o 12,5 mmol/l), Db (5 mg/ml) o rtPA (20 mg/ml), ya sea solo o en combinación, durante 24 horas antes de la medición de la muerte neuronal (cultivos independientes N= 2, n= 2-4, * $p < 0,05$; ns= no significativo). tPA indica activador de plasminógeno de tipo de tejido recombinante; Db, diacuerpo; NMDA, N-metil-D-aspartato.

Descripción detallada

La presente descripción se refiere al uso de derivados de anticuerpo biespecífico en el tratamiento de trastornos trombóticos. Estos derivados de anticuerpo biespecífico se dirigen a TAFI y PAI-1 e inhiben ambas proteínas en una estrategia de direccionamiento dual. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico es un diacuerpo conocido como Db-TCK26D6x33H1F7 y se puede usar en el tratamiento de trastornos trombóticos agudos. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra después del inicio del trastorno trombótico agudo. En ciertas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra a pacientes en riesgo de desarrollar trastornos trombóticos, ya sean trastornos trombóticos agudos o crónicos.

Se describen en esta memoria las secuencias ejemplares de derivados de anticuerpos biespecíficos o porciones de estos (SEQ ID N°s: 1-18). Además, los derivados de anticuerpos biespecíficos de la presente descripción pueden ser idénticos, sustancialmente idénticos, homólogos o similares a las secuencias ejemplares descritas en esta memoria.

"Identidad de secuencia" se refiere a dos secuencias o sub-secuencias de aminoácidos que son idénticas o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales (p. ej., 60% o 65% de identidad,

preferiblemente, 70%-95% de identidad, más preferiblemente, > 95% de identidad), cuando se compara y alinea para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o sobre una región designada, medida usando un algoritmo de comparación de secuencia como se conoce en la técnica o mediante alineamiento manual e inspección visual. En ciertas realizaciones, la identidad descrita existe sobre una región que es al menos aproximadamente 5 a 10 aminoácidos de longitud.

Las "regiones designadas" específicas en el contexto de la presente invención son las regiones CDR. Estas regiones CDR están típicamente conservadas (100% de identidad de secuencia en comparación con la secuencia de referencia), aunque se pueden permitir una o más sustituciones en uno o más CDRs siempre que se mantengan las propiedades funcionales del anticuerpo de referencia. Con regiones CDR que varían de 5 a casi 20 aminoácidos, las realizaciones típicas de un CDR modificado de unas secuencias de anticuerpo tienen una identidad de secuencia en la región CDR que es al menos un 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95% con la secuencia CDR de referencia.

Fuera de las regiones CDR, la secuencia de una cadena pesada o ligera variable puede estar menos restringida mientras se mantiene la función del anticuerpo. Por lo tanto, una cadena variable puede ser al menos un 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98 o 99% idéntica a una secuencia de referencia de una cadena variable mientras que una, dos o todas las tres secuencias CDR tienen una diferencia de aminoácidos con la secuencia CDR de referencia correspondiente o en donde todas las regiones CDR son idénticas a las de la secuencia de referencia.

Una diferencia en una determinada posición puede ser un cambio en cualquiera de los otros 19 aminoácidos o puede ser una denominada "sustitución conservativa".

Es un principio bien establecido de química de proteínas que se pueden hacer con frecuencia tales "sustituciones conservativas de aminoácidos" en una proteína sin alterar ni la conformación ni la función de la proteína. Dichos cambios incluyen la sustitución de cualquiera de estos isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por cualquier otro de estos aminoácidos hidrofóbicos; ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) por asparagina (N) y viceversa; y serina (S) por treonina (T) y viceversa. Sustituir cualquiera de estos triptófano (W), tirosina (Y) y fenilalanina (F) por cualquier otro de estos aminoácidos aromáticos y viceversa. También se pueden considerar otras sustituciones conservativas, dependiendo del entorno del aminoácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, glicina (G) y alanina (A) pueden ser con frecuencia intercambiables al igual que la alanina y la valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrofóbica, se puede intercambiar con frecuencia por leucina e isoleucina y, algunas veces, por valina. La lisina (K) y la arginina (R) son con frecuencia intercambiables en localizaciones en los que la característica significativa del residuo de aminoácido es su carga y no es significativa la diferencia de pKs de estos dos aminoácidos. "Anticuerpo biespecífico" se refiere a un constructo basado en anticuerpos que se puede unir simultáneamente a dos antígenos diferentes. En el contexto de la presente invención, esto significa unión específica a TAFI y unión específica a PAI-1.

"Diacuerpo" se refiere a un tipo específico de anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) de otro anticuerpo en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que es muy corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión al antígeno. En un diacuerpo, los sitios de unión al antígeno apuntan en direcciones opuestas.

Típicamente estos son complejos de constructos scFv. Son posibles diferentes configuraciones. Una configuración posible es un complejo de dos polipéptidos, denominados:

- una proteína de fusión de la región VH de un anticuerpo anti-TAFI y la región VL de un anticuerpo anti-PAI-1, con
 - una proteína de fusión de la región VL de un anticuerpo anti-TAFI y la región VH de un anticuerpo anti-PAI-1.
- Otros ejemplos son una cadena peptídica única con dos regiones VH y dos VL, que producen scFvs en tándem. O scFvs con péptidos enlazadores que son muy cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFvs a dimerizar.

El "dominio objetivo" se refiere a la parte del anticuerpo biespecífico que se requiere para obtener la unión específica al antígeno (dominio de unión al antígeno) con uno de los antígenos.

La "fibrinólisis" se refiere a la degradación de fibrina dentro de un coágulo de sangre.

La "trombolisis" se refiere a la degradación de un coágulo de sangre, entre otras cosas, la descomposición de los entramados de fibrina y otros elementos estructurales que forman un coágulo.

"TAFI" (inhibidor de fibrinólisis activable por trombina) también se conoce como Carboxipeptidasa B2 (CPB2), Carboxipeptidasa U (CPU) o carboxipeptidasa B plasmática (pCPB). TAFI es una enzima que reduce la fibrinólisis eliminando los residuos C-terminales de la fibrina que son importantes para la unión y la activación del plasminógeno.

“PAI-1” (inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)), también conocido como inhibidor del activador del plasminógeno endotelial o serpina E1. PAI-1 es un inhibidor de serín proteasas que activa el activador del plasminógeno de tejido (tPA) y la uroquinasa (uPA).

5 El trombo se refiere a un coágulo en el sistema cardiovascular formado durante la vida a partir de los constituyentes sanguíneos. Los coágulos, pueden ser oclusivos o anexos, están unidos al vaso o a la pared del corazón sin obstrucciones. Los tipos ejemplares de coágulos son coágulos de fibrina formados por depósitos de fibrina y los coágulos blancos o pálidos compuestos principalmente de plaquetas.

“tPA” (activador del plasminógeno de tejido) se refiere a la proteína de tipo salvaje, pero también abarca versiones modificadas conocidas como reteplasa, tenecteplasa.

10 La “trombosis” es una afección caracterizada por la formación de un coágulo de sangre dentro de un vaso sanguíneo y se cree que es el resultado de una anomalía en uno o más de estas hipercoagulabilidad, daño/disfunción endotelial y cambios hemodinámicos de estasis y turbulencia (juntos conocidos como la triada de Virchow). La trombosis puede dar lugar al bloqueo del vaso en el sitio de formación del coágulo, o al bloqueo del vaso a una distancia del sitio de origen (es decir, embolismo). En ambos casos, la obstrucción del vaso interrumpe el suministro de oxígeno a los tejidos suministrado por el vaso, lo que da como resultado la hipoxia, anoxia e infarto. Por
15 consiguiente, muchas afecciones patológicas surgen de la trombosis, que van desde la trombosis venosa profunda hasta el embolismo pulmonar y la trombosis arterial que causan ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares y más.

20 Los “trastornos trombóticos”, como se usan en esta memoria, incluyen, pero no se limitan a, trombosis venosa profunda (DVT), embolismo pulmonar (PE), enfermedad arterial coronaria (CAD) y síndrome coronario agudo (ACS), oclusión de la arteria central de la retina (CRAO), degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y trastornos trombóticos neurológicos, que incluyen accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico agudo (AIS), oclusión de la arteria cerebral media (MCAo), oclusión arterial periférica aguda (APAO) y más.

25 Los trastornos también pueden ser trastornos trombóticos neurológicos que comprenden enfermedades, trastornos o afecciones que afectan directa o indirectamente al funcionamiento normal o a la anatomía del sistema nervioso de un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia cerebrovascular, isquemia cerebral o infarto cerebral como accidente cerebrovascular, isquemia retiniana (diabética o de otro tipo), glaucoma, degeneración retiniana, esclerosis múltiple, neuropatía óptica isquémica, reperfusión seguida de isquemia cerebral aguda, lesión isquémica hipóxica perinatal o hemorragia intracraneal de cualquier tipo (que incluyen, pero no se limitan a, hemorragia epidural, subdural, subaracnoidea o intracerebral).
30

En ciertas realizaciones, el trastorno trombótico es de origen hereditario. En ciertas realizaciones, el trastorno trombótico es adquirido. El trastorno trombótico puede ser agudo, crónico y/o recurrente. En ciertas realizaciones, el trastorno trombótico es agudo y es al menos uno de estos accidente cerebrovascular isquémico (AIS), oclusión de la arteria cerebral media (MCAo), tromboembolismo, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio (MI), embolismo
35 pulmonar, enfermedad arterial periférica, trombosis de hígado y/o riñones, o bloqueo de catéter. La enfermedad trombótica puede ser un síndrome oclusivo en el sistema vascular cerebral, por ejemplo, que origina infartos cerebrales debidos a accidente cerebrovascular o accidente cerebrovascular isquémico. En algunas realizaciones, el trastorno trombótico es AIS. En ciertas realizaciones, el trastorno trombótico agudo es MCAo.

Derivados de anticuerpo biespecífico para usar en el tratamiento de trastornos trombóticos.

40 Los derivados de anticuerpo biespecífico representan el formato más pequeño actualmente disponible para lograr la biespecificidad cuando se comienza con dos IgGs para permitir una penetración eficaz en el coágulo sanguíneo. La doble especificidad confiere la inhibición de TAFI y de PAI-1 al mismo tiempo, la misma localización y la misma concentración, lo que da lugar a un perfil farmacocinético y a una biodistribución similares. En algunas realizaciones, los derivados de anticuerpos biespecíficos para usar en el tratamiento de trastornos trombóticos están basados en anticuerpos monoclonales (MA). Por ejemplo, los MA ejemplares que se dirigen a TAFI son MA-RT36A3F5 y MA-TCK26D6 [6, 7] [Hillmayer y cols., citados anteriormente; Vercauteren (2011) citado anteriormente], mientras los MAs
45 ejemplares que se dirigen a PAI-1 son MA-33H1F7 y MA-MP2D2 [De Brock citado anteriormente, Van De Craen citado anteriormente]. Un derivado de anticuerpo biespecífico ejemplar es DbTCK26D6x33H1F7 [Wyseure T. y cols., (2013) *J. Thromb Haemost.* 11, 2069-2071]. En ciertas realizaciones, la eficacia de los derivados de anticuerpos biespecíficos supera la de cualquiera de los MA administrados solos.
50

En algunas realizaciones de la invención reivindicada, el derivado de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idénticas a cada una de estas CDR1H de SEQ ID N°: 1; CDR2H de SEQ ID N°: 2; CDR3H de SEQ ID N°: 3; CDR1L de SEQ ID N°: 4; CDR2L de SEQ ID N°: 5 y CDR3L de SEQ ID N°: 6; y un segundo dominio objetivo que se
55 une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idénticas a cada una de estas

CDR1H de SEQ ID N°:7; CDR2H de SEQ ID N°: 8; CDR3H de SEQ ID N°: 9; CDR1L de SEQ ID N°: 10; CDR2L de SEQ ID N°: 11 y CDR3L de SEQ ID N°: 12.

Por ejemplo, el derivado de anticuerpo biespecífico puede comprender un primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) y comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a cada SEQ ID N°: 14; y un segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 16.

En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, un derivado de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 17 y un segundo dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 18.

La SEQ ID N°: 17 comprende en el lado N terminal la secuencia con la SEQ ID N°: 13 y en el lado C terminal la secuencia de la SEQ ID N°: 16.

La SEQ ID N°: 18 comprende en el lado N terminal la secuencia con la SEQ ID N°: 15 y en el lado C terminal la secuencia de la SEQ ID N°: 14.

En algunas realizaciones de la invención reivindicada, las secuencias de aminoácidos en los derivados de anticuerpos biespecíficos son al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% idénticas a las secuencias de aminoácidos descritas en las SEQ ID N°: 1-18. Por ejemplo, en la SEQ ID N°: 2, el segundo residuo amino (marcado con "X") puede ser Val o Ile (y, por consiguiente, en la SEQ ID N°: 13, el quincuagésimo primer residuo aminoácido (marcado con "X") puede ser Val o Ile. En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, las secuencias de aminoácidos en los derivados de anticuerpos biespecíficos tienen variaciones en residuos de aminoácidos que no afectan de manera significativa a las propiedades de unión de los derivados de anticuerpos biespecíficos a sus dianas. En algunas realizaciones de la invención reivindicada, las variaciones en residuos de aminoácidos pueden afectar a la estabilidad del derivado de anticuerpo biespecífico.

En algunas realizaciones de la invención reivindicada, el derivado de anticuerpo biespecífico, por ejemplo, como se describe en esta memoria, está humanizado.

Los anticuerpos biespecíficos descritos en esta memoria pueden no ser neurotóxicos en contraste con el tPA, y se pueden usar para reducir el tamaño de la lesión en pacientes que padecen una lesión cerebral. Las lesiones cerebrales pueden ser causadas por trastornos trombóticos, como accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico agudo (AIS) y/o oclusión de la arteria cerebral media (MCAo). La inflamación por trombo en pacientes que padecen un trastorno trombótico se puede reducir por anticuerpos biespecíficos.

Un efecto secundario peligroso del tratamiento trombolítico es el aumento del riesgo de hemorragia, por ejemplo, por hemorragia intracraneal. Los anticuerpos biespecíficos descritos en esta memoria se pueden usar para reducir o minimizar el sangrado y/o el riesgo de sangrado, ya que no prolongaron el sangrado en un modelo animal para el riesgo de sangrado, en contraste con el tPA. Además, la vida media relativamente corta de los anticuerpos biespecíficos puede minimizar los efectos secundarios como la hemorragia intracraneal en pacientes tratados con los anticuerpos biespecíficos.

Una consecuencia adicional de los trastornos trombóticos como el accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico agudo (AIS) y/o oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) son las alteraciones neurológicas. En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos descritos en esta memoria se pueden usar para tratar alteraciones neurológicas como alteraciones motoras, sensoriales y/o cognitivas. Las alteraciones y/o limitaciones en la flexión de las extremidades, empuje lateral, agarre y más, se pueden tratar con los anticuerpos biespecíficos descritos en esta memoria.

Administración

El momento del tratamiento trombolítico es crítico. En el caso de trastornos trombóticos agudos como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico agudo o embolismo pulmonar agudo masivo, el tPA se administra típicamente para romper los coágulos dentro de las 15 horas posteriores al accidente cerebrovascular, por ejemplo, tan pronto como sea posible después del inicio de los síntomas de accidente cerebrovascular, a las 0-6 horas, o a las 4,5 horas. De manera similar, en algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo específico, como se describe en esta memoria, se administra entre las 0-15 horas del inicio de los síntomas del trastorno trombótico. El trastorno trombótico puede ser un trastorno trombótico agudo, como un accidente cerebrovascular, por ejemplo, AIS o MCAo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se administra a las 0,5 horas, 1 hora, 1,5 horas, 3 horas, 4 horas, 4,5 horas o más horas después del inicio de los síntomas del trastorno trombótico, por ejemplo, a las 4,5 horas del inicio de los síntomas. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecífico se administra 12 horas después

del inicio de los síntomas del trastorno trombotico. El derivado de anticuerpo biespecifico se puede administrar por vía intravenosa o directamente dentro del coágulo de sangre.

Hasta la fecha, los activadores de plasminogeno como el tPA son los únicos agentes trombolíticos aprobados por la FDA de los EE.UU., y los activadores de plasminogeno como el tPA siguen siendo el tratamiento primario de primera línea para los trastornos tromboticos agudos. Sin embargo, algunos pacientes no responden al tratamiento con tPA y se necesitan intervenciones adicionales. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecifico se administra junto con un activador de plasminogeno, por ejemplo, tPA. Por ejemplo, el derivado de anticuerpo biespecifico se puede administrar simultáneamente con el tPA, como un tratamiento de combinación. El derivado de anticuerpo biespecifico también se puede administrar después de que se administre primero el tPA. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecifico se administra 1 hora después de la administración del tPA. Si un paciente no responde al tPA dentro de 1 hora, se puede administrar el derivado de anticuerpo biespecifico como una intervención adicional.

Un resultado sorprendente e inesperado de la presente descripción es que los derivados de anticuerpos biespecificos eran igualmente eficaces en presencia o ausencia del tPA cuando se administraron hasta 90 minutos después de la oclusión. Además, los derivados de anticuerpos biespecificos tenían un efecto trombolítico superior al tPA. Por lo tanto, los derivados de anticuerpos biespecificos descritos en esta memoria se pueden usar como agentes trombolíticos en lugar de un activador de plasminogeno como el tPA. Un aspecto de la presente descripción se refiere a derivados de anticuerpos biespecificos descritos en esta memoria para usar en el tratamiento de un trastorno trombotico agudo, en donde se administra el derivado de anticuerpo biespecifico sin tPA. En ciertas realizaciones, el trastorno trombotico agudo se caracteriza por la presencia de un coágulo de sangre rico en fibrina. En algunas realizaciones, el trastorno trombotico agudo se caracteriza por la presencia de un coágulo de sangre rico en plaquetas. En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo biespecifico se administra sin tPA durante un periodo de tiempo de hasta 90 minutos después del inicio del trastorno trombotico agudo, por ejemplo, 0-90 minutos después del inicio. Por lo tanto, el derivado de anticuerpo biespecifico se puede administrar a los 0, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80 o 90 minutos después del inicio del trastorno trombotico agudo.

En algunas realizaciones, cuando el tratamiento para un trastorno trombotico agudo se administra al menos 90 minutos después del inicio del trastorno trombotico agudo, el derivado de anticuerpo biespecifico se administra junto con el tPA. La combinación de derivados de anticuerpos biespecificos y tPA se puede administrar a los 90 minutos después del inicio, o a las 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 3,5 horas, 4 horas, 4,5 horas, 5 horas, 5,5 horas, 6 horas o más después del inicio. En ciertas realizaciones, la administración del diacuerpo no da lugar a efectos neurotóxicos perjudiciales. Cuando se administra en combinación con tPA, el derivado de anticuerpo biespecifico puede potenciar el efecto trombolítico del tPA sin potenciar los efectos secundarios adversos observados con el tPA solo. Los derivados de anticuerpos biespecificos como se describen en esta memoria también se pueden combinar con tratamientos antiplaquetarios como aspirina, clopidogrel y dipyridamol; tratamientos anticoagulantes como heparina, warfarina y dabigatran; y/o intervenciones quirúrgicas como la revascularización, la endarterectomía carotídea, la angioplastia carotídea, la trombolisis intra-arterial y eliminación mecánica del émbolo en la isquemia cerebral (MERC1).

Los diacuerpos descritos en esta memoria se pueden distribuir como un bolo o se pueden administrar a lo largo de un largo periodo de tiempo.

La cantidad total de diacuerpo administrado a un paciente puede variar de 0,1, 0,5, 1 o kg de peso corporal hasta 2 o 5 mg/kg de peso corporal.

Dado que la administración de un exceso de anticuerpo no tiene efectos secundarios perjudiciales, se puede administrar una dosis total de 10, 20, 40, 80 o 100 mg de diacuerpo independientemente del peso corporal del paciente.

Prevención

Los trastornos tromboticos son comunes, particularmente en poblaciones de edad avanzada y/o en pacientes que se han afectado previamente por un trastorno trombotico. Los trastornos tromboticos pueden ser agudos o crónicos. Los factores de riesgo adicionales para el accidente cerebrovascular como AIS y/o MCAo incluyen edad avanzada, consumo de alcohol, aterosclerosis, fibrilación auricular, uso de píldoras anticonceptivas, diabetes, mala alimentación, antecedentes familiares de accidente cerebrovascular, displasia fibromuscular, presión arterial alta, colesterol alto, hipercoagulabilidad (ya sea hereditaria o adquirida), inflamación, bajo peso al nacer, migraña, obesidad, foramen oval permeable, inactividad física, terapia hormonal posmenopáusica, accidente cerebrovascular previo, ciertas razas/etnias, enfermedad de células falciformes, apnea del sueño, ataque isquémico transitorio, consumo de tabaco y más. Los factores de riesgo para la trombosis venosa, como la trombosis venosa profunda (DVT), que es una causa frecuente de embolismo pulmonar incluyen, pero no se limitan a, edad avanzada, cirugía mayor, cirugía ortopédica, cáncer, inmovilización, embarazo, síndrome antifosfolípido, trauma, lesión menor en la pierna, trombosis venosa previa, uso de anticonceptivos orales, terapia de reemplazo hormonal, catéteres venosos centrales, enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunes, síndrome nefrótico, obesidad, infección, VIH, policitemia vera y quimioterapia, así como factores de riesgo hereditarios que incluyen, pero no se limitan a, deficiencia de antitrombina, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, Factor V Leiden, Protrombina G20210A, disfibrogenemia y tipo de sangre no 0. Los factores de riesgo adicionales incluyen, pero no se limitan a, niveles bajos

de proteína S, resistencia a la proteína C activada, niveles altos de Factor VIII, hiperhomocisteinemia y/o altos niveles de fibrinógeno, Factor IX y/o Factor XI.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un anticuerpo biespecífico para usar en pacientes con riesgo de desarrollar un trastorno trombótico agudo o crónico, que comprende un primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idénticas a cada una de estas CDR1H de SEQ ID N°:1; CDR2H de SEQ ID N°: 2; CDR3H de SEQ ID N°: 3; CDR1L de SEQ ID N°: 4; CDR2L de SEQ ID N°: 5 y CDR3L de SEQ ID N°: 6; y un segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por secuencias de aminoácidos que son al menos un 80% idénticas a cada una de estas CDR1H de SEQ ID N°:7; CDR2H de SEQ ID N°: 8; CDR3H de SEQ ID N°: 9; CDR1L de SEQ ID N°: 10; CDR2L de SEQ ID N°: 11 y CDR3L de SEQ ID N°: 12, en donde el derivado de anticuerpo biespecífico se administra antes del inicio del trastorno trombótico agudo o crónico. En ciertas realizaciones, el trastorno trombótico agudo o crónico es tromboembolismo.

Por ejemplo, el derivado de anticuerpo biespecífico puede comprender un primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) y comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 14 y un segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 16.

En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, un derivado de anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 17 y un segundo dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 18.

En algunas realizaciones de la invención reivindicada, las secuencias de aminoácidos en los derivados de anticuerpos biespecíficos son al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% idénticas a las secuencias de aminoácidos descritas en las SEQ ID N°: 1-18. Por ejemplo, en la SEQ ID N°: 2, el segundo residuo amino (marcado con "X") puede ser Val o Ile (y, por consiguiente, en la SEQ ID N°: 13, el quincuagésimo primer residuo de aminoácido (marcado como "X") puede ser Val o Ile.

Ejemplos

Habiendo proporcionado una descripción general, los siguientes ejemplos ayudan a ilustrar la descripción general. Se incluyen estos ejemplos específicos simplemente para ilustrar ciertos aspectos y realizaciones de la descripción y no pretenden ser limitantes en ningún aspecto. Ciertos principios generales descritos en los ejemplos, sin embargo, pueden ser generalmente aplicables a otros aspectos o realizaciones de la descripción.

Ejemplo 1. Mejorar la expresión y eficacia de un inhibidor biespecífico inestable (Db-RT36A3F5x33H1F7) frente a TAFI y PAI-1 a través de ingeniería de anticuerpos

A. Injerto de CDR para diseñar dominios variables estables

En un estudio anterior se generó scFv-RT36A3F5, pero las bacterias no pudieron producirlo y se encontró que el Db-RT36A3F5x33H1F7 correspondiente era inestable, lo que dio lugar a un efecto disminuido sobre la lisis del coágulo. Por lo tanto, se optimizaron los dominios variables de MA-RT36A3F5 por injerto de región determinante de complementariedad (CDR) en las estructuras estables de scFv-4D5 (Fig. 1A) [Jung S. & Plückthun A. (1997) *Protein Eng.* 10, 959-966. Este artículo describe el anticuerpo 4D5 humanizado usado en el injerto de CDR]. Se realizaron dos abordajes: (i) estrategia basada en el alineamiento estructural de scFv-RT36A3F5 y de scFv-4D5, generando scFv-RT36A3F5-4D5DM (en colaboración con el Prof. Marc Demaeyer) y (ii) estrategia basada en la evidencia, generando scFv-RT36A3F5-4D5 [Ewert S. y cols., (2004) *Methods* 34, 184-199]. El último abordaje también se realizó en las estructuras estables de scFv-T12D11 (un anticuerpo anti-TAFI descrito en Develter y cols. 2008 *J. Thromb. Haemost.* 6, 1884-1889, generando scFv-RT36A3F5-T12D11. El análisis de transferencia de Western reveló que únicamente scFv-RT36A3F5-4D5 se expresó y se secretó adecuadamente (Fig. 1B, calle 1) y, por lo tanto, estos dominios CDR injertados se usaron en los constructos (sc) Db correspondientes.

B. Producción de inhibidores basados en anticuerpos biespecíficos a partir de MA-RT36A3F5 y MA-33H1F7

Se formaron cuatro inhibidores biespecíficos a partir de MA-RT36A3F5 y MA-33H1F7: Db-RT36A3F5x33H1F7 (Db), Db-RT36A3F5-4D5x33H1F7 (Db con CDR injertado), scDb-33H1F7xRT36A3F5 (scDb con un enlazador flexible adicional entre los dominios variables de MA-RT36A3F5) y scDb-33H1F7xRT36A3F5-4D5 (scDb con CDR injertado) (Fig. 2). Como resultado del injerto de CDR, la expresión bacteriana y eucariota de Db y scDb respectivamente fue elevada (para Db con CDR injertado aproximadamente 1,5 mg/l de cultivo que corresponde con un aumento de dos veces frente a Db y para scDb con CDR injertado 11 ± 1 mg/l de medio de cultivo que corresponde a un aumento de diez veces frente a scDb).

C. Propiedades inhibitoras de inhibidores inespecíficos

Las propiedades inhibitoras de los anticuerpos parentales se conservaron en Db, Db con CDR injertado y scDb con CDR injertado según se confirmó mediante ensayos funcionales. Las propiedades inhibitoras de scDb no se pudieron evaluar debido a una producción insuficiente.

5 D. Estabilidad y propiedades pro-fibrinolíticas de diacuerpos en plasma de rata con citrato

De todos los constructos, solamente scDb con CDR injertado exhibió una estabilidad similar a la del diacuerpo control, Db-T12D11x33H1F7 (88 ± 13 % de actividad residual de unión después de tres horas a 37°C ; Fig. 3A). Con un efecto pro-fibrinolítico relativo de 0.81 ± 0.23 , el scDb con CDR injertado también fue el constructo más potente en comparación con MA-RT36A3F5 (Fig. 3B). No se pudo evaluar la contribución del efecto de la fracción inhibitora de PAI-1 en el sistema de ensayo basado en plasma debido a los bajos niveles plasmáticos basales de PAI-1.

En conclusión, nuestros esfuerzos para aumentar la estabilidad plasmática de un inhibidor inestable basado en anticuerpos inespecíficos frente a TAFI y PAI-1 de rata dieron como resultado un scDb con CDR injertado que exhibe un aumento de estabilidad y de efecto pro-fibrinolítico de siete veces. Este derivado de anticuerpo tiene reacción cruzada con TAFI de ratón y con PAI-1 de ratón, lo que permite la evaluación adicional *in vivo* en ratones y ratas.

15 Ejemplo 2. Evaluación *in vitro* de las propiedades pro-fibrinolíticas de un nuevo inhibidor inespecífico frente a TAFI y PAI-1.

A. Generación de Db-TCK26D6x33H1F7

Sobre la base de la generación satisfactoria de scFvs estables con capacidad inhibitora conservada de los anticuerpos parentales respectivos (MA-TCK26D6 y MA-33H1F7), se generó Db-TCK26D6x33H1F7. Este diacuerpo contiene dos cadenas polipeptídicas como se representa en la figura 2 abajo a la izquierda. La primera es una proteína de fusión de la cadena VH del anticuerpo anti TAFI y la cadena VL del anticuerpo anti PAI-1. La segunda es una proteína de fusión de la cadena VL del anticuerpo anti TAFI y la cadena VH del anticuerpo anti PAI-1.

El nivel de producción de Db-TCK26D6x33H1F7 era de aproximadamente 2 mg/l de cultivo.

B. Caracterización del efecto inhibidor hacia TAFI y PAI-1

25 Las propiedades inhibitoras de los anticuerpos parentales frente a TAFI y PAI-1 humanos y de ratón se conservaron en Db-TCK26D6x33H1F7 como se confirmó mediante ensayos funcionales. Además, Db-TCK26D6x33H1F7 permaneció estable después de la incubación en plasma humano, de ratón y de rata después de 8 horas a 37°C .

C. Efecto de Db-TCK26D6x33H1F7 durante el análisis tromboelastométrico en sangre completa

30 Para evaluar el efecto pro-fibrinolítico debido a la inhibición de TAFI y PAI-1 se incubó Db-TCK26D6x33H1F7 en sangre humana completa de cuatro individuos y se analizó su efecto mediante tromboelastometría [Wyseure T. y cols. (2013) *J Thromb Haemost.* 11, 2069-2071]. La adición combinada de ambos MA, así como la adición del diacuerpo facilitaron la fibrinólisis en un grado muy significativo ($p < 0.001$), mientras que la adición de un único MA solo causó solo un efecto modesto (Fig. 4A).

35 El efecto de Db-TCK26D6x33H1F7 también se evaluó en sangre completa de ratones. Dado que los niveles de PAI-1 son extremadamente bajos en ratones (niveles en suero, media $\pm$ SD, $n = 4$, 3.0 ± 0.3 ng/ml para ratones frente a 267 ± 114 ng/ml para humanos), el análisis tromboelastométrico en sangre de ratones es insensible a PAI-1. Para aumentar los niveles de PAI-1 en sangre de ratón, se indujo una endotoxemia experimental a través de una inyección intraperitoneal de LPS (0,5 mg/kg) antes de la recogida de sangre para el análisis tromboelastométrico. La adición combinada de ambos MAs, así como la adición del diacuerpo facilitaron la fibrinólisis en un grado significativo ($p < 0.05$), mientras que la adición de un único MA no causó ningún efecto significativo (Fig. 4B).

Por lo tanto, Db-TCK26D6x33H1F7 exhibe fuertes propiedades pro-fibrinolíticas *in vitro*.

Ejemplo 3. Evaluación *in vivo* de las propiedades pro-fibrinolíticas de un inhibidor inespecífico frente a TAFI y PAI-1

1. Efecto complementario de la inhibición dual de TAFI/PAI-1 después del desafío trombótico sistémico

45 Los ratones, pre-tratados con una dosis de MA-TCK26D6 o MA-33H1F7 dirigidos a todos los antígenos circulantes, se sometieron a tromboembolismo mediante administración sistémica de tromboplastina. La deposición de fibrina en los pulmones solo disminuyó a los niveles basales después de la administración de un inhibidor de TAFI (Fig. 5). Dado que los niveles de PAI-1 son extremadamente bajos en ratones, no se detectó ningún efecto de inhibición de PAI-1.

50 Para evaluar la inhibición simultánea de TAFI y PAI-1 en este modelo, se indujo endotoxemia para aumentar los niveles de PAI-1 en plasma. La deposición de fibrina en los pulmones se redujo a través de la inhibición de TAFI con MA-TCK26D6 (5 mg/kg) o a través de la inhibición de PAI-1 con MA-33H1F7 (10 mg/kg). Sin embargo, esta reducción no alcanzó un grado máximo. Después de administrar una mezcla de MA-TCK26D6 (5 mg/kg) y MA-33H1F7 (10 mg/kg),

los niveles de fibrina en los pulmones volvieron a los basales (Fig. 6A). Este efecto máximo desapareció cuando se disminuyeron las dosis de MA a 1 mg/kg (Fig. 6B). Después del tratamiento con el diacuerpo (Db-TCK26D6x33H1F7 a 0,8 mg/kg, es decir, una dosis que se dirige la misma cantidad de TAFI y PAI-1 que se alcanza con los MA combinados a 1 mg/kg), se obtuvo un efecto máximo de eliminación de fibrina de los pulmones.

- 5 Como se demostró, la inhibición simultánea de TAFI y PAI-1 da como resultado un efecto aditivo sobre la eliminación de fibrina en un modelo de tromboembolismo que es más eficaz a través de Db-TCK26D6x33H1F7.

2. Efecto de Db-TCK26D6x33H1F7 en modelos de ratón para accidente cerebrovascular isquémico agudo

i. MCAo mediada por monofilamento

- La oclusión transitoria se logró haciendo avanzar un monofilamento en la MCA. Este modelo se usó para evaluar el efecto de la inhibición de TAFI y/o PAI-1 sobre la isquemia cerebral /daño por reperusión. Este modelo produce típicamente grandes volúmenes de lesión en ratones no tratados que tienen defectos neurológicos/motores medibles. Lo más importante en la evaluación preclínica del accidente cerebrovascular es evaluar los parámetros neurológicos además del tamaño de la lesión. Curiosamente, en este modelo, el tPA tiene un efecto nocivo bien descrito a través del agravamiento del daño neuronal después de la isquemia cerebral focal [Wang YF. y cols. (1998) *Nat. Med.* 4, 228-231]. El tratamiento con MA-TCK26D6 a 25 mg/kg o con MA-33H1F7 a 6 mg/kg originó lesiones cerebrales reducidas (Fig. 7A, 7D) y una recuperación neurológica y motora concomitante 24 después de la oclusión (Fig. 7B-C, 7E-F). Además, los cerebros de los ratones tratados contenían menor fibrina(ógeno) en el lado ipsilateral en comparación con los de los ratones control (Fig. 7G). La IgG control en el control de IgG era MA-T30E5 en la Figura 7 y MA-NB27B3 en la Figura 8. El tratamiento con uno de los anticuerpos parentales a 1 mg/kg no alteró el tamaño de las lesiones o las puntuaciones neurológicas/motoras 24 después de la oclusión (Fig. 8A-C). Sin embargo, la administración combinada de los anticuerpos redujo sustancialmente las lesiones cerebrales 1,9 veces (Fig. 8A). Además, el diacuerpo a una dosis correspondiente originó una reducción similar en el tamaño de la lesión (2,3 veces), aunque mejoró concomitantemente las puntuaciones neurológicas y motoras (Fig. 8A-C). Los tamaños de las lesiones fueron $76 \pm 11 \text{ mm}^3$ con vehículo, $81 \pm 11 \text{ mm}^3$ con IgG control, $43 \pm 8 \text{ mm}^3$ con la combinación de MA y $35 \pm 8 \text{ mm}^3$ con diacuerpo. Además, el análisis de transferencia de Western reveló que la combinación de anticuerpos parentales o el diacuerpo redujo eficazmente la deposición masiva de fibrina inducida por el daño por reperusión al menos 2 veces (Fig. 8D; $p < 0,05$; $n = 3-4$ ratones/grupo).

ii. MCAo mediada por trombina

- Se usó un modelo de accidente cerebrovascular tromboembólico mediante inyección de trombina en el que los coágulos son ricos en fibrina y, por lo tanto, susceptibles de ser lisados mediante trombolisis por tPA. La eficacia del diacuerpo se comparó con la del tPA, el agente trombolítico actual. Con el fin de imitar el procedimiento clínico de trombolisis, se realizó la administración de tPA mediante un bolo inicial del 10% de volumen seguido de una infusión del 90% durante 40 minutos debido a la corta vida media del tPA circulante (~ 5 minutos) [Chandler WL. y cols. (1997) *Circulation* 96, 761-768]. 24 horas después de la oclusión, se produjo una recanalización completa de la luz arterial en todos los grupos que incluye el grupo del vehículo (puntuación angiográfica media= 2, Fig. 9B). En el mismo momento, la imagen de contraste de Speckle mostró una reducción del 40% en la perfusión tisular en el territorio de la MCA distal a la oclusión en el grupo de vehículo (Fig. 9C). Curiosamente, la perfusión cerebral se restauró de manera virtual mediante la combinación de diacuerpo y tPA (Fig. 9C; $p < 0,05$ frente al vehículo; $n = 6-8$ ratones/grupo), mientras que el diacuerpo o el tPA por separado no aumentaron significativamente la perfusión. El volumen de la lesión se redujo mediante la administración de tPA, sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa ($37 \pm 13 \text{ mm}^3$ frente a $26 \pm 12 \text{ mm}^3$, figuras 9A; $p = 0,203$; $n = 6-8$ ratones/grupo). En contraste, la administración temprana del diacuerpo (0,8 mg/kg) a los 20 minutos después de la oclusión, independientemente de la administración de tPA, redujo sustancialmente el volumen de la lesión a las 24 horas ($15 \pm 4 \text{ mm}^3$ para el diacuerpo y $15 \pm 8 \text{ mm}^3$ para el diacuerpo + tPA; $p < 0,01$ y $p < 0,05$ frente al vehículo, respectivamente; $n = 6-8$ ratones/grupo Fig. 9A) [las figuras 9A y 9D muestran las mismas condiciones]. También se retrasaron los tratamientos en un punto del tiempo clínicamente más relevante, p. ej., 90 después de la oclusión (punto de tiempo intermedio) [Hacke W. y cols. (2004) *Lancet* 363, 768-774], también se observó la recanalización completa a las 24 horas después de la oclusión en todos los grupos de tratamiento (puntuación angiográfica media= 2). Ni la administración retrasada intermedia del diacuerpo ni la infusión de tPA tuvieron algún efecto beneficioso en el volumen de la lesión ($25 \pm 3 \text{ mm}^3$ (vehículo) frente a $24 \pm 3 \text{ mm}^3$ (tPA) frente a $21 \pm 4 \text{ mm}^3$ (Db); Figura 9E; $n = 9-10$ ratones/grupo). Sin embargo, en el mismo tiempo de tratamiento, la administración del diacuerpo antes de la infusión de tPA dio como resultado una reducción significativa del volumen de la lesión ($15 \pm 2 \text{ mm}^3$ (Db + tPA); $p < 0,05$ frente al vehículo; $n = 10$ ratones/grupo; Figura 9E).

Ninguno de los tratamientos tuvo un efecto sobre el tamaño de las lesiones en este modelo cuando se administró a los 240 minutos después de la oclusión (punto de tiempo tardío, Figura 9F).

- 55 A los 90 minutos después del inicio del accidente cerebrovascular y en adelante, el tratamiento con tPA no siempre da como resultado un resultado beneficioso, presumiblemente debido a la mayor estabilidad del coágulo (es decir, retracción del coágulo) lo que da como resultado la resistencia trombolítica, el efecto neurotóxico del tPA en el cerebro dañado progresivamente y/o el mayor riesgo de transformación hemorrágica. En el presente ejemplo, ni el tratamiento con tPA ni el tratamiento con diacuerpo a los 90 minutos después de la oclusión redujeron los volúmenes de la lesión.

Sin embargo, el tratamiento combinado del diacuerpo y el tPA dio como resultado una disminución significativa del volumen de la lesión, subrayando el potencial beneficio clínico de añadir el diacuerpo al tratamiento trombolítico actual. En un momento posterior del tratamiento de 4 horas después de la oclusión, se observó una tendencia al aumento de los volúmenes de la lesión después del tratamiento con tPA, solo o con el diacuerpo (Figura 9F). En correspondencia con los datos de neurotoxicidad *in vitro* (Fig. 14), el diacuerpo tampoco tuvo efecto nocivo *in vivo*.

iii. MCAo mediada por FeCl₃

Los coágulos ricos en plaquetas son más resistentes al tratamiento con tPA [Kim EY. y cols. (2006) *Neurology* 67, 1846-1848]. Por lo tanto, se usó un modelo de MCAo inducido por FeCl₃ en el que los coágulos son ricos en plaquetas y, por lo tanto, imitan este problema clínicamente relevante. Como se esperaba, el tPA no era eficaz en (i) aumentar el CBF 1 hora después de la oclusión (rastreo con láser Doppler; Fig. 10A), (ii) mejorar la puntuación angiográfica 24 horas después de la oclusión (Fig. 10C), (iii) reducir el volumen de la lesión 24 horas después de la oclusión (Fig. 10C) o (iv) aumentar la perfusión cerebral 24 horas después de la oclusión (imagen de contraste de Speckle, Fig. 10D). El diacuerpo administrado a 1,6 mg/kg aumentó significativamente el CBF 1 hora (Fig. 10A; $p < 0,05$ frente al vehículo; $n = 8-15$ ratones/grupo) y la puntuación angiográfica 24 horas después de la oclusión (Fig. 10C; $p < 0,05$ frente al vehículo; $n = 8-15$ ratones/grupo), sin embargo, no se observó mejoría de la perfusión cerebral o del volumen de la lesión 24 horas después de la oclusión (Fig., 10B, D). Por el contrario, a 3,6 mg/kg, el diacuerpo aumentó significativamente el CBF a 1 hora después de la oclusión (Fig. 10A; $p < 0,05$ frente al vehículo; $n = 8-15$ ratones/grupo) lo que dio como resultado una puntuación angiográfica significativamente aumentada (Fig. 10C; $p < 0,05$; $n = 8-15$ ratones/grupo), volumen de la lesión reducido (Fig. 10B; $p < 0,05$; $n = 8-15$ ratones/grupo) y una perfusión cerebral aumentada (Fig. 10D; $p < 0,05$; $n = 8-14$ ratones/grupo) a las 24 horas.

En conclusión, el fuerte potenciador fibrinolítico designado como Db-TCK26D6x33H1F7 mostró un rendimiento robusto *in vivo* en un conjunto de modelos de ratón de accidente cerebrovascular.

Ejemplo 4. Expresión *in vivo* de inhibidores biespecíficos frente a TAFI y PAI-1

Se expresaron scDBs *in vivo* ya que se pueden producir eficazmente en células eucariotas. Se generaron los siguientes constructos frente a TAFI y PAI-1 y se clonaron en pcDNA3.1.: scDb-33H1F7xRT36A3F5, scDb-TCK26D6x33H1F7 y scDb-TCK26D6xMP2D2. Los niveles de expresión *in vitro* en células HEK293T oscilaron entre 0,6 -1,1 mg/ml (Fig. 11A). El scDb-33H1F7xRT36A3F5 se optimizó adicionalmente mediante injerto de CDR en scDb-33H1F7xRT36A3F5-4D5, lo que dio como resultado una expresión diez veces mayor y una estabilidad plasmática siete veces mayor (después de tres horas de incubación a 37°C). En ratones, los niveles plasmáticos máximos después de la transferencia génica fueron 584 ± 79 ng/ml ($n = 6$) y 188 ± 19 ng/ml ($n = 4$) para scDb-33H1F7xRT36A3F5-4D5 en el día 3 y para scDb-TCK26D6x33H1F7 en el día 6, respectivamente, sin embargo, no se pudo detectar ninguna expresión de scDb-TCK26D6xMP2D2 (Fig. 11C). Como los niveles plasmáticos obtenidos eran demasiado bajos para la evaluación farmacológica, se alteró la estabilidad farmacocinética de los scDBs para prolongar la vida media circulante. Para este fin, se fusionó un dominio de unión a albúmina diseñado por afinidad [Jhonson A. y cols. (2008) *Protein Eng. Des. Sel.* 21, 515-527] con el extremo C-terminal de scDb-TCK26D6x33H1F7 y de scDb-TCK26D6xMP2D2, que fueron los únicos constructos que permanecieron estables durante la incubación en plasma a 37°C hasta tres días (Fig. 11B). Los constructos que unen albúmina se designaron como scDb-TCK26D6x33H1F7xABDH y scDb-TCK26D6xMP2D2xABDH. Desafortunadamente, se observó una reducción *in vitro* de la expresión de dos a cuatro veces para estos constructos (Fig. 11A). Sin embargo, los niveles de expresión *in vivo* se aumentaron dos veces en el día 9 (287 ± 28 ng/ml, $n = 5$) para la variante de unión a albúmina de scDb-TCK26D6x33H1F7, mientras que la expresión de la variante de unión a albúmina de scDb-TCK26D6xMP2D2 no fue detectable (Fig. 11C).

Ejemplo 6. Evaluación del sangrado y la farmacocinética

Se realizaron experimentos adicionales de sangrado de la cola para comparar los efectos de una inyección IV de tPA a dos dosis diferentes: la dosis equivalente a la usada en la práctica clínica para seres humanos (1 mg/kg) y a la usada típicamente en ratones (10 mg/kg). El diacuerpo (scDb-TCK26D6x33H1F7) se inyectó a 0,8 mg/kg y a 3,6 mg/kg. La inyección IV del diacuerpo hasta 3,6 mg/kg no alteró el tiempo de sangrado de la cola o la pérdida acumulativa de hemoglobina después de 60 minutos de incubación de la cola, mientras que ambas dosis de tPA prolongaron el tiempo de sangrado y aumentaron la pérdida de hemoglobina (Fig. 12A y Fig. 12B; $n = 9-16$ ratones/grupo). La administración conjunta del diacuerpo (0,8 mg/kg) y tPA (10 mg/kg), el régimen de tratamiento probado en el modelo de MCAo mediado por trombina, no aumentó aún más el tiempo de sangrado de la cola ni la pérdida de hemoglobina en comparación con la administración de tPA solo.

De manera alternativa, no se observaron hemorragias cerebrales en los modelos de accidente cerebrovascular MCAo mecánico o trombotico después de cualquier tratamiento.

La vida media circulante del diacuerpo después de la administración IV en ratones fue de 121 minutos (Fig. 13) lo que permite la inyección en bolo como tratamiento agudo.

Materiales y métodos

Producción de diacuerpos (Db) y diacuerpos de cadena sencilla (scDb)

Los derivados de anticuerpos se produjeron clonando dominios variables (V_H , V_L) a partir de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales. Se diseñaron los fragmentos de ADN que contienen Db o scDb para la producción bacteriana (a través de secreción periplásmica) y producción eucariótica (a través de secreción extracelular), respectivamente. Los fragmentos de ADN se produjeron sintéticamente y se clonaron adicionalmente en pSKID2 para la producción de Db en *E. coli* RV308 y en pcDNA3.1. para la producción de scDb usando células HEK293T. Estos derivados de anticuerpo con cola de His₆ se purificaron en una columna de Ni⁺⁺ y, antes de la evaluación *in vivo* de endotoxinas, se eliminaron mediante cromatografía de intercambio aniónico.

10 Cuantificación de (sc)Db

Los (sc)Dbs se cuantificaron mediante un ELISA basado en la unión simultánea hacia PAI-1 y TAFI. Brevemente, se usó una placa de microtitulación recubierta con PAI-1 de ratón para unir (sc)Db y la detección se realizó a través de la incubación posterior con TAFI de ratón, seguido de la adición de MA-TCK32G12-HRP frente a TAFI, que se revela posteriormente usando o-fenilendiamina como sustrato cromogénico.

15 Ensayo de neutralización de TAFI

Se cuantificó la capacidad de los derivados de anticuerpos para inhibir el TAFI usando un ensayo cromogénico para medir la actividad residual TAFIa y se comparó con las propiedades inhibitoras del anticuerpo monoclonal parental (MA). TAFI se incubó con MA o con sc(Db) a concentraciones que varían de una relación molar de 0,06 a 8 veces sobre TAFI, antes o después de la activación por trombina/trombomodulina o plasmina, dependiendo del mecanismo de actuación del MA. Se determinó la actividad residual de TAFIa usando Hippuryl-Arg como un sustrato, seguido de una reacción colorimétrica.

Ensayo de neutralización de PAI-1

Se cuantificó la capacidad de los derivados de anticuerpos para inhibir el PAI-1 usando un método cromogénico acoplado a plasminógeno y se comparó con las propiedades inhibitoras del MA parental. El PAI-1 se incubó previamente (2 horas a temperatura ambiente) con MA o (sc)Db a concentraciones que varían de una relación molar de 0,06 a 32 veces sobre PAI-1. Después de una incubación consecutiva con tPA (15' a 37°C), se añadió plasminógeno y se cuantificó el grado de conversión a plasmina mediante un sustrato cromogénico.

Ensayo de lisis del coágulo en plasma *in vitro*

Se incubó previamente el plasma citrado de rata (10', 37°C) con MA o sc(Db), seguido de la adición de CaCl₂ y tPA. La lisis del coágulo se monitorizó luego a lo largo del tiempo a través de la medición de la turbidez (OD_{405 nm}) mediante un lector de placas de microtitulación. El grado de fibrinólisis se expresó como el área bajo la curva durante un periodo de tiempo de 180 minutos. Los datos recuperados se normalizaron al valor obtenido en presencia de MA (a una concentración correspondiente al número equivalente de sitios de unión a los antígenos respectivos como el de sc(Db)).

35 Tromboelastometría rotacional

Se incubó previamente la sangre completa citrada de cuatro donantes sanos o de ratones (sanos o endotoxémicos mediante inyección intraperitoneal de LPS (0,5 mg/kg) seis horas antes del inicio del experimento con MA o Db (a concentraciones que producen un número equivalente de sitios de unión a los respectivos antígenos). La coagulación y la posterior fibrinólisis se iniciaron mediante tromboplastina, CaCl₂ y tPA. Para la sangre humana, la fibrinólisis se determinó mediante la disminución de la amplitud a los 45 minutos después de la coagulación inicial en relación con la amplitud máxima ($L(\%) = [(A_{max} - A_{45}) / A_{max}] * 100$). En cada ejecución, la lisis basal (L_{wo}) se determinó usando la misma muestra de sangre sin MA o Db (L_{wo} nunca excedió el 12%). Se determinó entonces la lisis específica mejorada con inhibidor como DL ($\% = L_{inhibidor} - L_{wo}$). Para la sangre de ratón, la lisis basal (L_{wo}) se determinó usando la misma muestra de sangre sin MA o Db (L_{wo} nunca excedió el 12%). Se determinó entonces la lisis específica mejorada con inhibidor como la diferencia en el área bajo la curva (AUC desde el tiempo de coagulación hasta el tiempo de coagulación + 120 minutos) entre la solución salina (AUC_{wo}) y la afección tratada ($AUC_{inhibidor}$) en relación con el AUC_{wo} ($D \text{ AUC relativa} = [(AUC_{wo} - AUC_{inhibidor}) / AUC_{wo}] * 100$).

Modelos *in vivo*

Modelo de tromboembolismo

50 Se inyectó MA, diacuerpo o solución salina (NaCl al 0,9%) por vía intravenosa (IV) en ratones SWISS en ayunas toda la noche no anestesiados (sanos o endotoxémicos por inyección intraperitoneal de LPS (0,5 mg/kg) tres horas antes del inicio del experimento). Cinco minutos después, se indujo el tromboembolismo mediante inyección IV de tromboplastina. Los ratones se anestesiaron con pentobarbital (60 mg/kg intraperitonealmente) y 15 minutos después del desafío trombótico se perfundieron los pulmones con 10 U/ml de heparina. Luego los pulmones se aislaron y se

homogeneizaron. El homogeneizado lavado de (izquierdo) pulmón se incubó con 2 mM de microplasma con el fin de convertir la fibrina en productos de degradación de la fibrina solubilizada para la posterior cuantificación de los productos de degradación de la fibrina usando un ELISA de reacción cruzada con el fibrinógeno de ratón. El contenido en fibrina en los pulmones se expresó como equivalentes de fibrinógeno (mg/ml).

5 Modelo de MCAo mediado por trombina y por FeCl₃

Se colocaron ratones SWISS anestesiados (mediante inhalación de mezcla isoflurano/oxígeno al 2%) en un dispositivo estereotáxico para exponer la arteria cerebral media derecha (MCA) mediante craniectomía. Se realizó la oclusión *in situ*, según se confirmó mediante flujometría láser Doppler, por microinyección de alfa-trombina murina en la MCA [Orset C. y cols., (2007) *Stroke* 38, 2771-2778] o por aplicación de un papel de filtro saturado con FeCl₃ al 20% [Karatas H. y cols., (2011) *J Cereb Blood Metab.* 231, 1452-1460]. Se inyectó Db o PBS (vehículo) por vía IV 15 minutos después del inicio del coágulo. Cinco minutos después, se administró tPA (10 mg/kg) o solución salina a través de un catéter en la vena de la cola (el 10% como un bolo y el 90% en infusión durante 40 minutos). 24 horas después de la oclusión inicial, se mapeó el flujo sanguíneo cerebral en el lado ipsi- y contralateral exponiendo el cráneo a un lector de imágenes de contraste Speckle (Moor FLPI-2, Moor instruments). La reducción del flujo sanguíneo se expresó en relación con el lado contralateral. El volumen de la lesión cerebral se determinó mediante resonancia magnética ponderada en T2, la puntuación angiográfica en la MCA (0= oclusión, 1= recanalización parcial y 2= recanalización completa) se determinó mediante angiografía por RM y la resonancia magnética ponderada en T2* se usó para excluir la aparición de hemorragias.

Para evaluar diferentes puntos de tiempo de tratamiento en el modelo mediado por trombina, se inyectó por vía intravenosa el diacuerpo (Db) o vehículo (PBS) a través de un catéter en la vena de la cola en ciertos puntos de tiempo después de la oclusión: un punto de tiempo temprano (15 min), intermedio (90 min) o tardío (240 min). Cinco minutos después de la administración del diacuerpo o del vehículo, se administró por vía IV el tPA (10 mg/kg) o solución salina (el 10% como un bolo y el 90% en infusión durante 40 minutos). El volumen de la lesión cerebral se determinó mediante resonancia magnética ponderada en T2, la puntuación angiográfica en la MCA (0= oclusión, 1= recanalización parcial y 2= recanalización completa) se determinó mediante angiografía por RM y la resonancia magnética ponderada en T2* se usó para excluir la aparición de hemorragias.

Modelo de MCAo mediado por monofilamento

Después de una incisión en la piel de línea media en el cuello de ratones C57BL/6 anestesiados (mediante inhalación de mezcla de isoflurano/oxígeno al 2%), se ligaron la arteria carótida proximal común y la arteria carótida externa. El origen de la MCA derecha se ocluyó insertando un monofilamento de nylon 6.0 recubierto de goma de silicona estandarizado a través de la arteria carótida interna derecha. Después de 60 minutos de oclusión *in situ*, se retiró el monofilamento intraluminal y 5 minutos después de la perfusión se inyectó por vía IV MA o PBS. 24 horas después de la oclusión inicial, los ratones se sometieron a pruebas funcionales: la prueba de Bederson modificada y la prueba de agarre para evaluar la función neurológica y motórica, respectivamente. Después se sacrificaron los ratones y se recogieron los cerebros para determinar los volúmenes de la lesión (mediante tinción con cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio).

Pruebas neurológicas

24 horas después de la oclusión (modelo de MCAo), los ratones se sometieron a la prueba de Bederson modificada y a la prueba de agarre para evaluar la función neurológica y la función motórica globales, respectivamente. Esta prueba de Bederson modificada usa el siguiente sistema de puntuación: 0, sin déficit; 1, flexión de las extremidades anteriores; 2, disminución de la resistencia al empuje lateral; 3, círculos unidireccionales; 4, rotación unilateral; 5, sin movimiento.

Se realizó la prueba de agarre, en la que se colocó un ratón sobre una barra de madera (3 mm de diámetro, 40 cm de largo) unida a 2 soportes verticales a 40 cm por encima de una superficie plana. Cuando se coloca el ratón en la barra a medio camino entre los soportes, el experimento se calificó de acuerdo con el siguiente sistema: 0, se cae; 1, se cuelga de la barra por las dos patas delanteras; 2, lo mismo que en 1, pero intenta subir a la barra; 3, se cuelga de la barra con las dos patas delanteras más 1 o ambas patas traseras; 4, se cuelga de la barra con las 4 patas más la cola envuelta alrededor de la barra; 5, escapa (el ratón es capaz de alcanzar uno de los soportes). La evaluación se realizó a ciegas.

Cuantificación de la lesión

24 horas después de la oclusión (modelo de MCAo), los ratones se sacrificaron. Los cerebros se recogieron rápidamente y se cortaron en secciones coronales de 2 mm de grosor usando una matriz de corte de cerebro de ratón. Se evaluó la presencia de hemorragias cerebrales de manera visual. Los cortes se tiñeron con cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio al 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS para distinguir tejido sano de infartos no teñidos. Los cortes teñidos se fotografiaron con una cámara digital Nikon D70 y las áreas de infarto (blancas) se midieron a ciegas usando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Extracción de proteínas y análisis de transferencia de Western

El tejido isquémico, que incluye el córtex y los ganglios basales, se diseccionó a partir de cortes de cerebro teñidos con TTC y fijados en formalina en tampón RIPA (Tris 25 mmol/l pH 7,4, NaCl 150 mmol/l, NP40 al 1%) que contenía SDS al 0,1% y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) al 0,25% como se describió previamente con ligeras modificaciones. Se homogeneizaron 39 muestras usando un mezclador CLI12 seguido de incubación a 4°C durante 20 minutos y sonicación posterior en hielo. Los lisados de tejidos se centrifugaron a 15.000 x g durante 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes se sometieron a análisis de transferencia de Western como sigue. Se cargaron 30 mg de proteína total, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear durante 1 h con tampón de bloqueo (leche desnatada al 5%, Tris-HCl 50 mmol/l pH 7,5, NaCl 150 mmol/l, Tween-20 al 0,05%), las membranas se incubaron con anticuerpo policlonal anti-fibrinógeno (AP00766PU-N, Acris; diluido 1:500) o MA anti-actina (MAB1501, Millipore; diluido 1:500) a 4°C durante toda la noche o durante 1 h, respectivamente. Luego se lavaron las membranas seguido de incubación con anti-IgG de conejo en cabra conjugado (Jackson ImmunoResearch; diluido 1/14.000) (fibrinógeno) o anti-IgG de ratón en cabra (Dako; diluido 1:2.000) (actina) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron usando Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) y la señal se detectó con un mini lector de imágenes LAS-4000 (GE Healthcare).

Ensayo de sangrado de la cola

Se determinaron los tiempos de sangrado de la vena de la cola de ratón con un ensayo de recorte de la cola, como se describió previamente. Se les administró a los ratones PBS, diacuerpo, tPA como una administración única o diacuerpo 5 minutos antes del tPA como una administración conjunta a través de inyección en la vena proximal de la cola. Cinco minutos después de la inyección, se cortó un segmento distal de 3 mm y la cola amputada se sumergió inmediatamente en solución salina isotónica al 0,9% a 37°C. Se registró el tiempo de sangrado hasta el cese inicial de sangrado (es decir, no volver a sangrar en 30 s.). Los experimentos se llevaron a cabo cegados a los tratamientos. Se determinó la pérdida acumulativa de hemoglobina durante un periodo de 60 minutos después del recorte de la cola. Posteriormente a la centrifugación (10 minutos a 2.000 x g), se volvieron a suspender las células sanguíneas en 1 ml de solución salina isotónica y se midió el contenido de hemoglobina en un contador Cell-Dyn 3500 (Abbott, Diegem, Bélgica).

Determinación de la vida media circulante

Se administró Db-TCK26D6x33H1F7 (0,8 mg/kg) mediante inyección por vía IV en la vena de la cola en ratones (n=6). Antes del experimento, se extrajo sangre con citrato trisódico al 0,38% (= muestra previa). Después de la inyección, se extrajo sangre con citrato trisódico al 0,38% a varios puntos de tiempo: 5 minutos, 45 minutos, 3 horas, 6 horas y 24 horas. Se determinaron las concentraciones del diacuerpo en las muestras de plasma correspondientes mediante un ELISA basado en la unión simultánea del diacuerpo a PAI-1 y a TAFI. Los pocillos de las placas de microtitulación de poliestireno se incubaron con 200 ml de PAI-1 recombinante de ratón en PBS (pH 7,4; 4mg/ml) durante 72 horas a 4°C, se vaciaron y se trataron durante dos horas con PBS suplementado con albúmina de suero bovina al 1% (m/v). Después de lavar, se añadieron diluciones en serie de dos veces (180 ml) de muestras de plasma a los pocillos y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego se lavaron los pocillos y se incubaron con 170 ml de TAFI de ratón (0,1 mg/ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las placas y se añadió a los pocillos 160 ml de MA-TCK32G12 conjugado con HRP (dirigido frente a TAFI) seguido de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Todas las etapas de lavado se realizaron con PBS que contenía Tween 80 (0,002%) y las diluciones se hicieron en PBS que contenía Tween 80 (0,002%) y albúmina de suero bovina (0,1% m/v). El ELISA se desarrolló usando 150 ml de tampón fosfato sódico 0,2 mol/l-citrato 0,1 mol/l, pH 5,0, que contenía 300 mg/ml de o-fenilén diamina y agua oxigenada al 0,01%. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción de la peroxidasa se paró con 50 ml de H₂SO₄ a 4 mol/l. Se midió la absorbancia a 492 nm. Se usó Db-TCK26D6x33H1F7 como calibrador.

Transferencia génica por electroporación *in vivo*

Se sangraron previamente ratones SWISS anestesiados (mediante inhalación de mezcla de isoflurano/oxígeno al 2%). Ambos músculos cuádriceps recibieron una inyección de hialuronidasa tres horas antes a la inyección del plásmido de ADN (pcDNA3.1. que contiene scDb), seguido de electroporación. Los ratones se sangraron a través de punción retro-orbital para preparar plasma citrado con el fin de determinar los niveles de expresión (*cfr.* 3.2) hasta 15 días después de la inyección de ADN.

Neurotoxicidad

Se prepararon cultivos neuronales a partir de embriones de ratón Swiss (día embrionario 14). Se diseccionaron las cortezas y se disociaron en DMEM y se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (0,1 mg/ml) y laminina (0,02 mg/ml). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 5%, suero de caballo al 5% (ambos de Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) y 2mM de glutamina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂ del 5%. Para inhibir la proliferación de la glía, se añadió citosina b-D-arabinósido (10 mM) después de 3 días *in vitro* (DIV) a los cultivos corticales.

La excitotoxicidad se indujo a 12-13 DIV por exposición a NMDA (10 mM) en DMEM libre de suero suplementado con 10 mM de glicina durante 24 horas. El NMDA se aplicó solo o junto con rtPA (20 mg/ml) y/o diacuerpo (5 mg/ml). Como

un control, se añadió el diacuerpo al cultivo neuronal a 12-13 DIV a diferentes concentraciones (0,5 mg/ml – 50 mg/ml) en ausencia de NMDA. Después de 24 horas, se cuantificó la muerte neuronal mediante la medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada de las células dañadas en el medio de baño (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se determinó el nivel de LDH correspondiente a la muerte neuronal máxima (muerte completa, FK) en cultivos hermanos expuestos a 500 mM de NMDA. Se determinaron los niveles de LDH de fondo en cultivos hermanos sometidos a lavados de control. Los valores experimentales se midieron después de restar LDH_{min} y luego se normalizaron a $LDH_{max} - LDH_{min}$ para expresar los resultados en porcentaje de muerte neuronal.

Análisis estadístico

Todos los datos cuantitativos se presentan como media y error estándar de la media (SEM). Se obtuvo la vida media circulante del diacuerpo después de un ajuste no lineal de los niveles de plasma representados frente al tiempo (Graphpad Prism Versión 5, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE.UU.). El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism Versión 5 (GraphPad Software). Las curvas de tromboelastometría (obtenidas a partir de la herramienta Export) se integraron con GraphPad Prism 5. Se realizó una prueba de chi cuadrado para comparar las puntuaciones angiográficas de diferentes grupos de tratamiento. Se excluyeron los valores atípicos realizando la prueba de Grubb. Antes del análisis estadístico, se usó la prueba de normalidad de D'Agostino y Pearson para verificar la distribución de datos. Se usó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para la comparación estadística de los volúmenes de lesión y los datos de imágenes de contraste de Speckle después de la MCAo inducida por $FeCl_3$ y se usó una prueba de t de student desapareada para la comparación estadística de volúmenes de lesión después de la MCAo mecánica. Se usó la prueba de ANOVA Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple de Dunn para la comparación estadística de: (i) parámetros tromboelastométricos para la lisis, D L y D AUC relativa, (ii) equivalentes de fibrinógeno pulmonar en el modelo de tromboembolismo venoso; (iii) volúmenes de lesión y datos de contraste de imágenes de Speckle en el modelo de MCAo inducido Ila; (iv) datos de láser Doppler en el modelo de MCAo inducido por $FeCl_3$ y (v) tiempos de sangrado de la cola y contenidos de hemoglobina. Se realizó una prueba de Mann-Whitney para el análisis estadístico de datos neurológicos/motores, niveles de fibrinógeno después de la tMCAo mecánica y datos de neurotoxicidad *in vitro*. Los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos.

Secuencias descritas en la solicitud

Texto subrayado: secuencias CDR

Los residuos N terminales Met y Ala en la SEQ ID N°: 17 y 18 son del péptido señal PeIB

Texto en negrita: enlazadores y marcadores sintéticos

SEQ ID N°	Descripción	Secuencia
SEQ ID N°: 1	VH TCK26D6 CDR1	<u>DNNMD</u>
SEQ ID N°: 2	VH TCK26D6 CDR2	<u>SXYSNNGGTIYNQKFKG</u> (donde X puede ser V o I)
SEQ ID N°: 3	VH TCK26D6 CDR3	<u>EMSDGPYWFFDV</u>
SEQ ID N°: 4	VL TCK26D6 CDR1	<u>RASENIFRNLV</u>
SEQ ID N°: 5	VL TCK26D6 CDR2	<u>SATNLVD</u>
SEQ ID N°: 6	VL TCK26D6 CDR3	<u>QHFWGTPRT</u>
SEQ ID N°: 7	VH 33H1F7 CDR1	<u>DTYIH</u>
SEQ ID N°: 8	VH 33H1F7	<u>RIDPANGNTKYDSKFQD</u>

	CDR2	
SEQ ID Nº: 9	VH 33H1F7 CDR3	<u>GDYDYVYFDY</u>
SEQ ID Nº: 10	VL 33H1F7 CDR1	<u>RASQDISNFLD</u>
SEQ ID Nº: 11	VL 33H1F7 CDR2	<u>YTSRLHS</u>
SEQ ID Nº: 12	VL 33H1F7 CDR3	<u>QQGNTFPPT</u>
SEQ ID Nº: 13	VH TCK26D6	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTD <u>NNMD</u> WAKQSHGK SLEWIGS <u>SXYSNNGGTIYNQKFKG</u> KATLNVDTSSTAYMELRSLT SEDTAVYYCAREMSDGPYWFFDVWGTGTTVTVSG (donde X puede ser V o I)
SEQ ID Nº: 14	VL TCK26D6	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC <u>RASENIFRN</u> LVWYQQKQGKSP QLLVYSATNLVDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC <u>QHFWGTPRTFGGGTKLEIKR</u>
SEQ ID Nº: 15	VH 33H1F7	QVQLQQSGAEVVKPGASVKLACTASGFNIKDTY <u>IHWV</u> KQGPEQ GLEWIGRIDPANGNTKYDSKFQDKATITADTSNTAYLHLSSLTS EDTAVYYCVRG <u>DYDYVYFDY</u> WGQGTTVTVSS
SEQ ID Nº: 16	VL 33H1F7	QSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLDWYQQKPDGTV KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISKLEQEDIATYFC <u>QQ</u> <u>GNTFPPTFGGGTKLEIKR</u>
SEQ ID Nº: 17	Polipéptido 1	MAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDNNMDWAKQSH GKSLEWIGSIYSNNGGTIYNQKFKGKATLNVDTSSTAYMELRSL TSEDTAVYYCAREMSDGPYWFFDVWGTGTTVTVSG AKTTPKLG G DIQMTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLDWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISKLEQEDIATYFCQ QNGTFPPTFGGGTKLEIKR ADAAAAGSEQKLISEEDLN SHHH HHH
SEQ ID Nº: 18	Polipéptido 2	MAQVQLQQSGAEVVKPGASVKLACTASGFNIKDTYIHWVKQGP EQGLEWIGRIDPANGNTKYDSKFQDKATITADTSNTAYLHLSSL TSEDTAVYYCVRGDYDYVYFDWGQGTTVTVSS AKTTPKLGGD IQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIFRNLVWYQQKQGKSPQ LLVYSATNLVDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQH FWGTPRTFGGGTKLEIKR ADTAPTGSEQKLISEEDLN SHHHHHH

Listado de secuencias

<110> Katholieke Universiteit Leuven Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Declerck, Paul De Meyer, Simon Geukens, Nick Gils, Ann Rubio, Marina Vivien, Denis Wyseure, Tine

<120> Dual targeting of TAFI and PAI-1

5 <130> KUL2091PCT

<150> US61/937, 323

<151> 07-02-2014

<150> GB1404879.7

<151> 19-03-2014

10 <150> GB1404880.5

<151> 19-03-2014

<150> GB1411979.6

<151> 04-07-2014

<150> GB1422609.6

15 <151> 2014-12-18

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp Asn Asn Met Asp

1 5

<210> 2

25 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> PRT

30 <222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser Val o Ile

<400> 2

Ser Xaa Tyr Ser Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

35

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

40 <400> 3

Glu Met Ser Asp Gly Pro Tyr Trp Phe Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

45 <213> Mus musculus

<400> 4
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Arg Asn Leu Val
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 5
 Ser Ala Thr Asn Leu Val Asp
 1 5

 <210> 6
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 6
 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr
 1 5

 15 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 7
 Asp Thr Tyr Ile His
 20 1 5

 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 25 <400> 8
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Ser Lys Phe Gln
 1 5 10 15

 Asp

 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus

 <400> 9
 Gly Asp Tyr Asp Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 10
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 10
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asp
 1 5 10

 <210> 11
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 11
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

5 <400> 12
Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 13
<211> 121
<212> PRT
10 <213> Mus musculus

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (51)..(51)
<223> Xaa puede ser Val o Ile

15 <400> 13
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Xaa Tyr Ser Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Asn Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Met Ser Asp Gly Pro Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly
115 120

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
20 <213> Mus musculus

ES 2 784 842 T3

<400> 14

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Arg Asn
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

5

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

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

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

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

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Asp Tyr Asp Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 784 842 T3

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Lys Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

5

<210> 17

<211> 266

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

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

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Asn Asn Met Asp Trp Ala Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Ser Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln
50 55 60

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Asn Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Met Ser Asp Gly Pro Tyr Trp Phe Phe Asp Val
100 105 110

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

Lys Leu Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
130 135 140

10

ES 2 784 842 T3

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
145 150 155 160

Ile Ser Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
195 200 205

Lys Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
210 215 220

Thr Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
225 230 235 240

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
245 250 255

Asp Leu Asn Ser His His His His His His
260 265

<210> 18

<211> 264

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

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

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

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Gly Pro Glu Gln Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Ser
50 55 60

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

ES 2 784 842 T3

Tyr	Cys	Val	Arg	Gly	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Val	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	100	105	110
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	115	120	125
Gly	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	130	135	140
Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Phe	145	150	155
Arg	Asn	Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	165	170	175
Leu	Val	Tyr	Ser	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	180	185	190
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	195	200	205
Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	210	215	220
Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	225	230	235
Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	245	250	255
Asn	Ser	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	260		

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico para usar en el tratamiento o prevención de un trastorno trombótico agudo en un paciente, en donde dicho anticuerpo comprende:

5 a. un primer dominio objetivo que se une específicamente al inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°: 1 de CDR1H, SEQ ID N°: 2 de CDR2H, SEQ ID N°: 3 de CDR3H, SEQ ID N°: 4 de CDR1L, SEQ ID N°: 5 de CDR2L y SEQ ID N°: 6 de CDR3L; y

10 b. un segundo dominio objetivo que se une específicamente al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por SEQ ID N°: 7 de CDR1H, SEQ ID N°: 8 de CDR2H, SEQ ID N°: 9 de CDR3H, SEQ ID N°: 10 de CDR1L, SEQ ID N°: 11 de CDR2L y SEQ ID N°: 12 de CDR3L.

2. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

15 a. el primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 14; y

comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°: 1 de CDR1H, SEQ ID N°: 2 de CDR2H, SEQ ID N°: 3 de CDR3H, SEQ ID N°: 4 de CDR1L, SEQ ID N°: 5 de CDR2L y SEQ ID N°: 6 de CDR3L, y en donde

20 b. un segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID N°: 16; y

25 comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) representadas por SEQ ID N°: 7 de CDR1H, SEQ ID N°: 8 de CDR2H, SEQ ID N°: 9 de CDR3H, SEQ ID N°: 10 de CDR1L, SEQ ID N°: 11 de CDR2L y SEQ ID N°: 12 de CDR3L.

3. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2,

30 en donde el primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID N°: 14; y

35 en donde el segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID N°: 16.

4. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3,

40 en donde el primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la SEQ ID N°: 14; y

en donde el segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a la SEQ ID N°: 16.

45 5. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4,

en donde el primer dominio objetivo que se une al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% idéntica a la SEQ ID N°: 13 y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% idéntica a la SEQ ID N°: 14; y

50 en donde el segundo dominio objetivo que se une al inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) comprende una región VH representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% idéntica a la SEQ ID N°: 15

y comprende una región VL representada por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% idéntica a la SEQ ID N°: 16.

6. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo biespecífico está humanizado.
- 5 7. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en donde el trastorno trombótico agudo da lugar a lesiones cerebrales.
8. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en donde el trastorno trombótico agudo se selecciona del grupo que consiste en, oclusión arterial periférica aguda, oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) y tromboembolismo como tromboembolismo venoso profundo y embolismo pulmonar.
- 10 9. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en un tratamiento de combinación con tPA.
10. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tratamiento se realiza sin la administración de tPA, antes, junto o después de la administración del anticuerpo biespecífico.
11. El anticuerpo biespecífico para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en donde el trastorno trombótico agudo se caracteriza por la presencia de un coágulo de sangre rico en plaquetas.
- 15

A.



B.

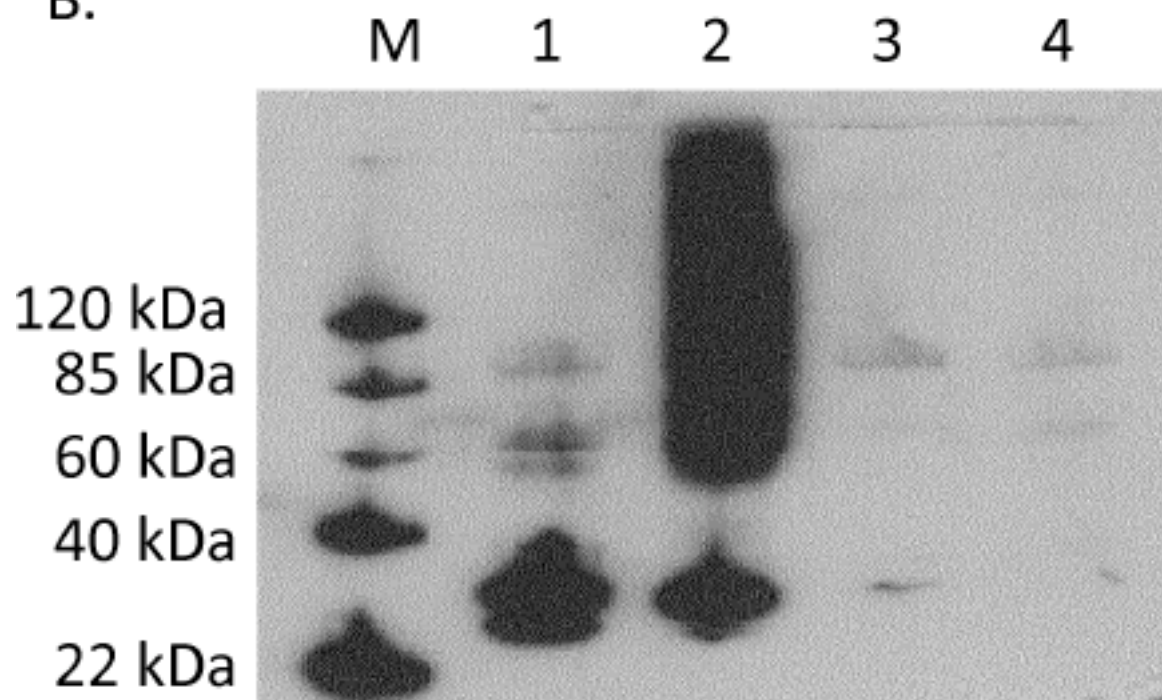


Figura 1

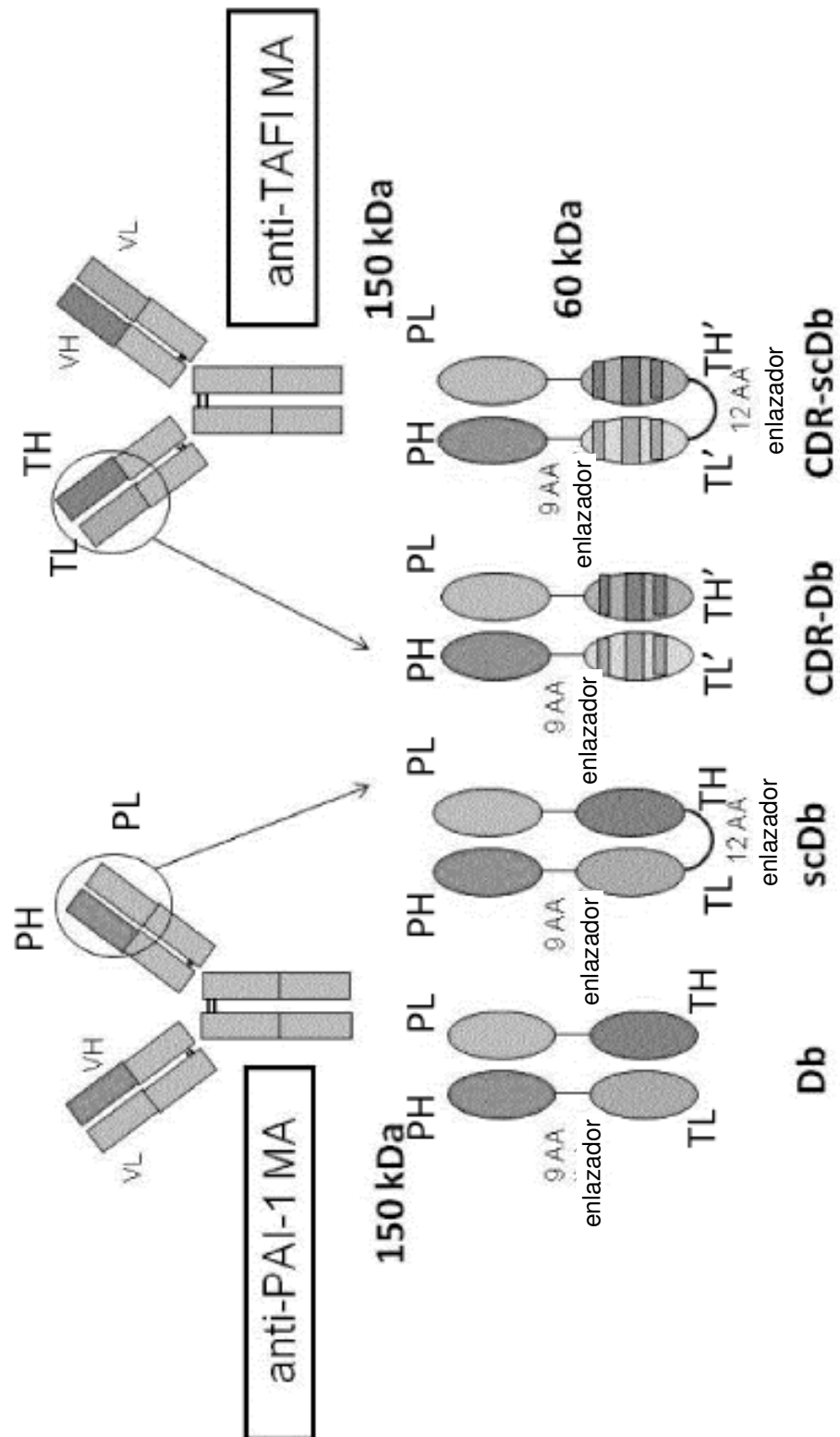


Figura 2

Figura 3

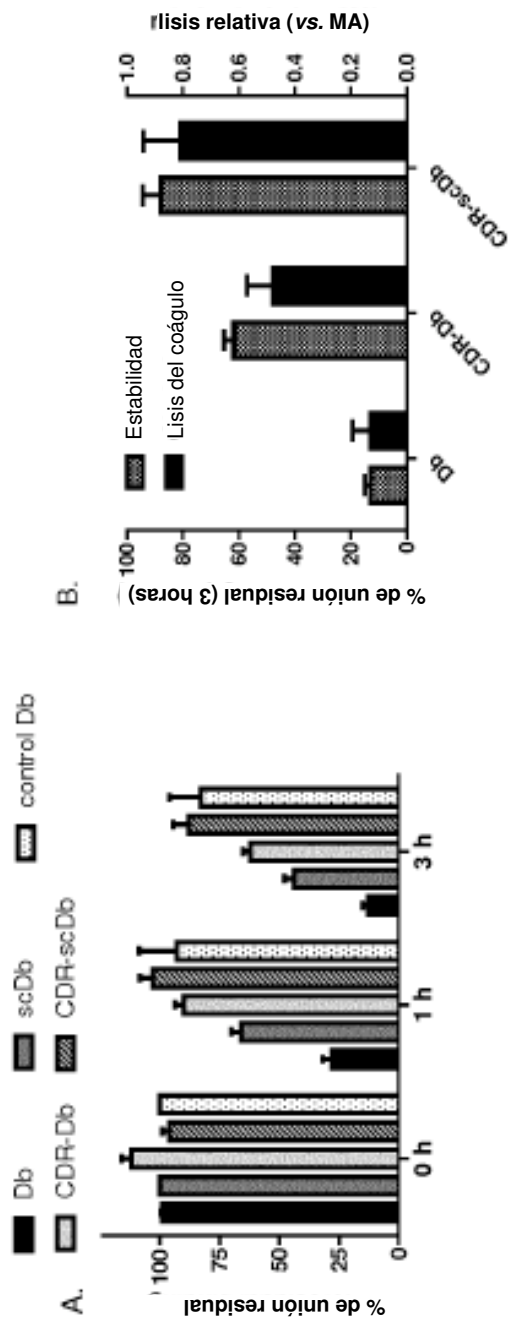
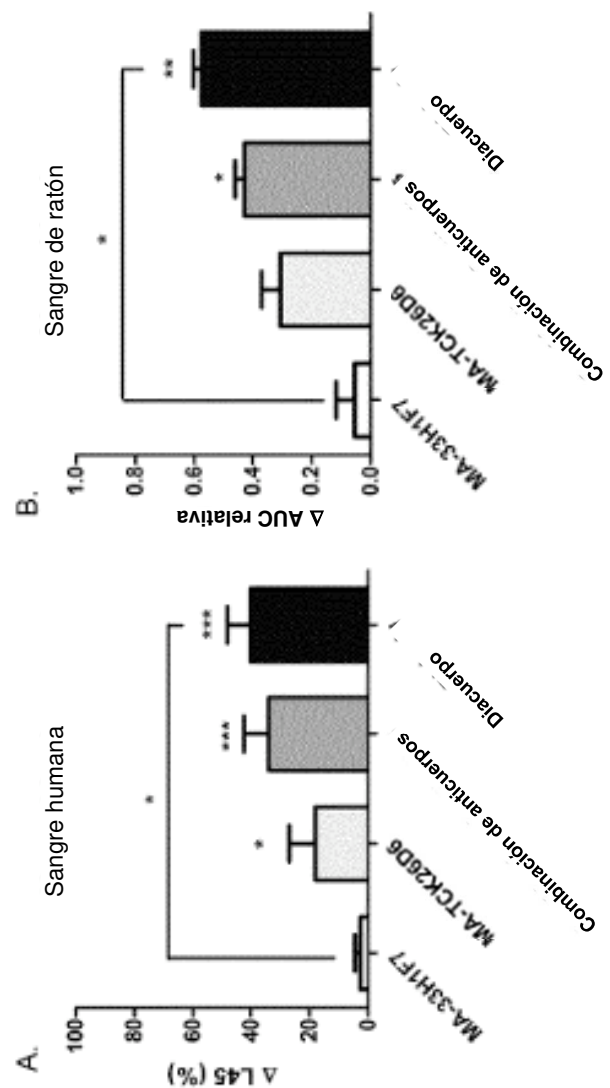


Figura 4



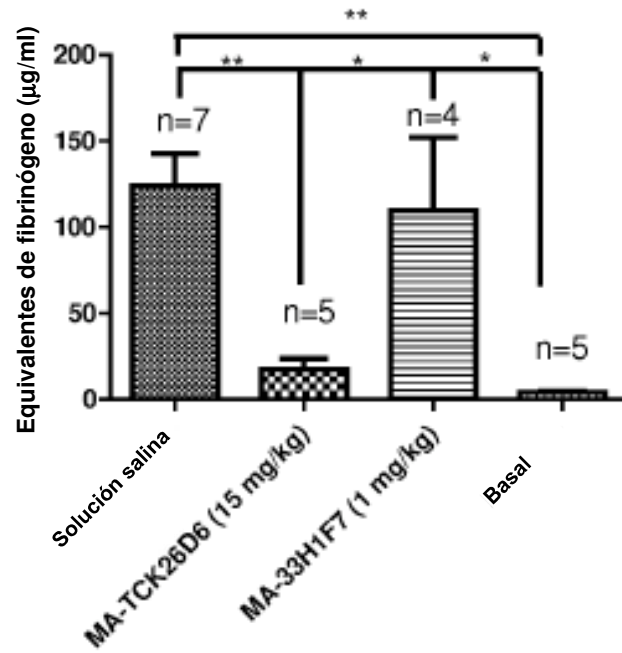


Figura 5

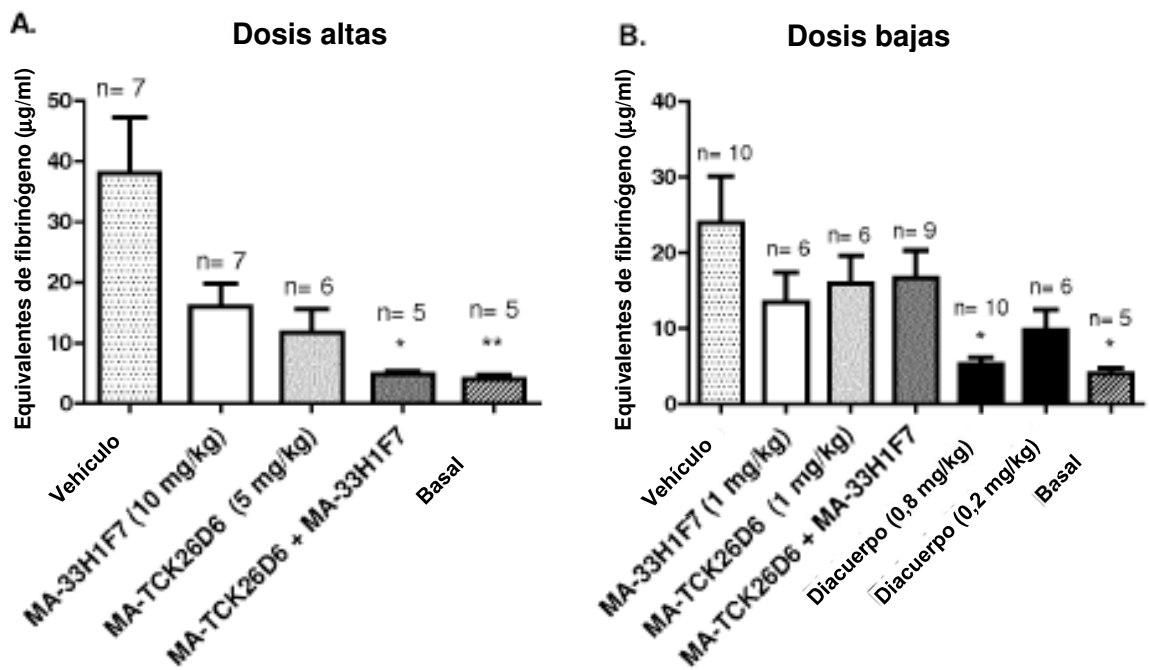


Figura 6

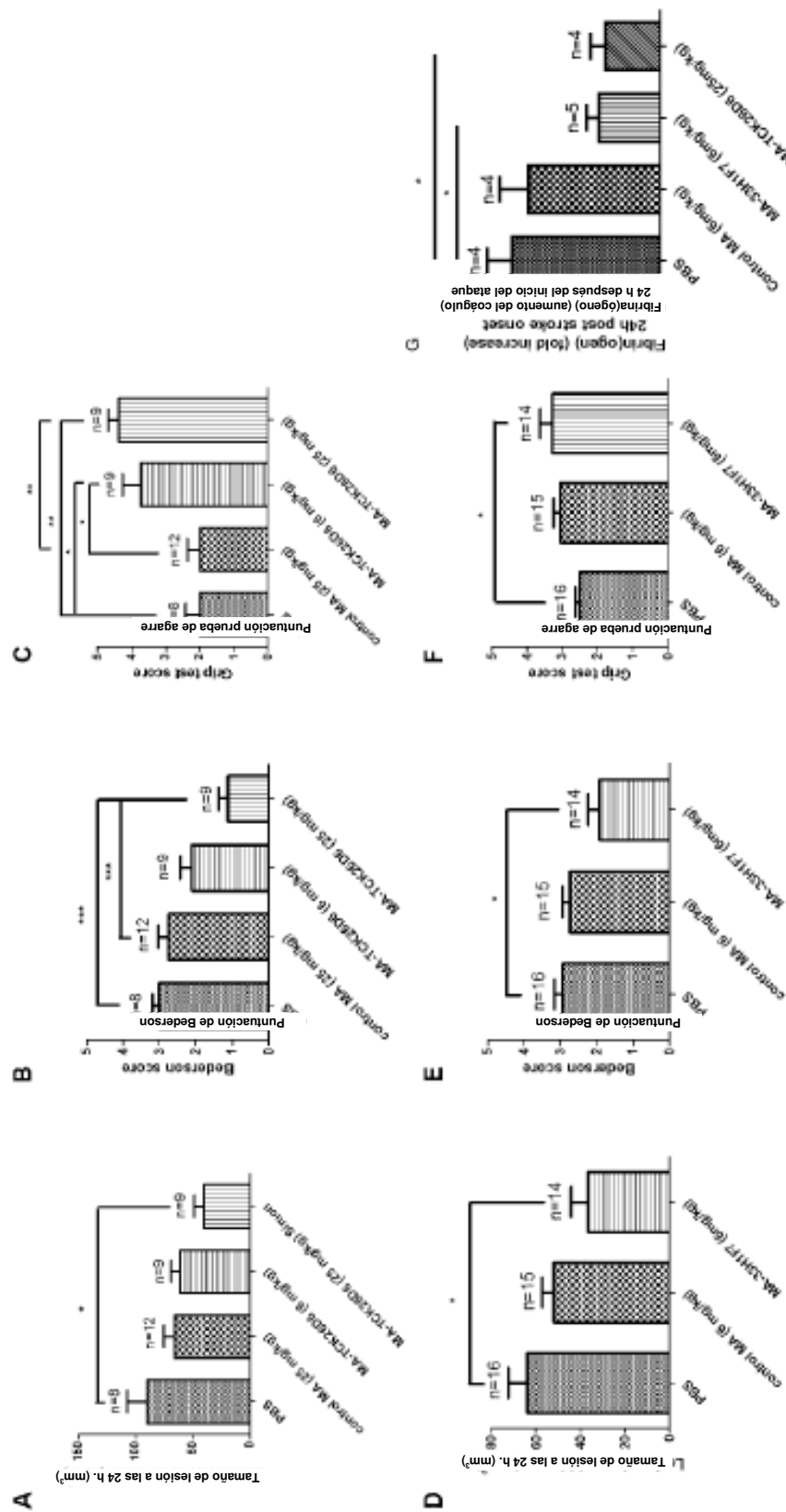


Figura 7

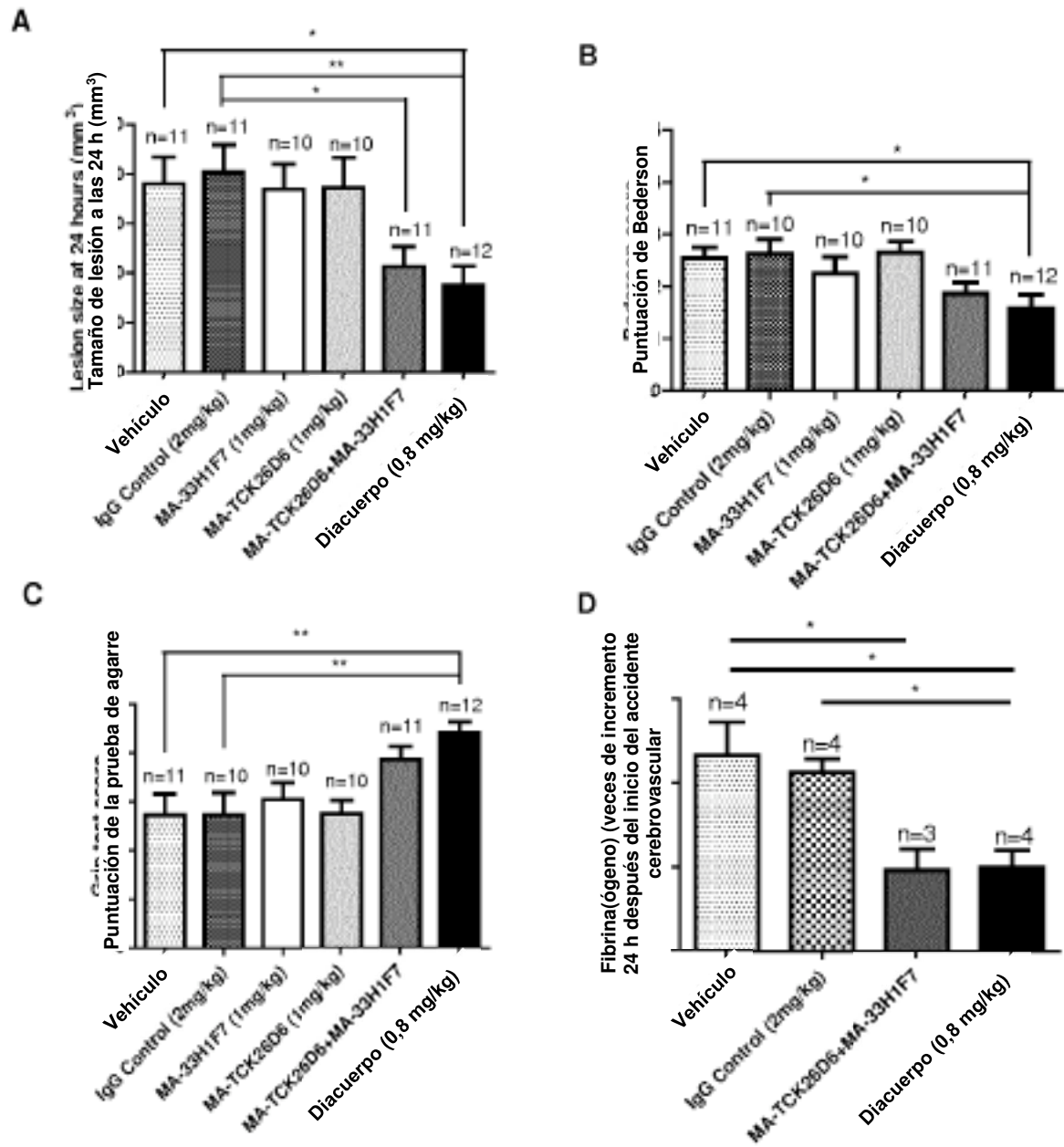


Figura 8

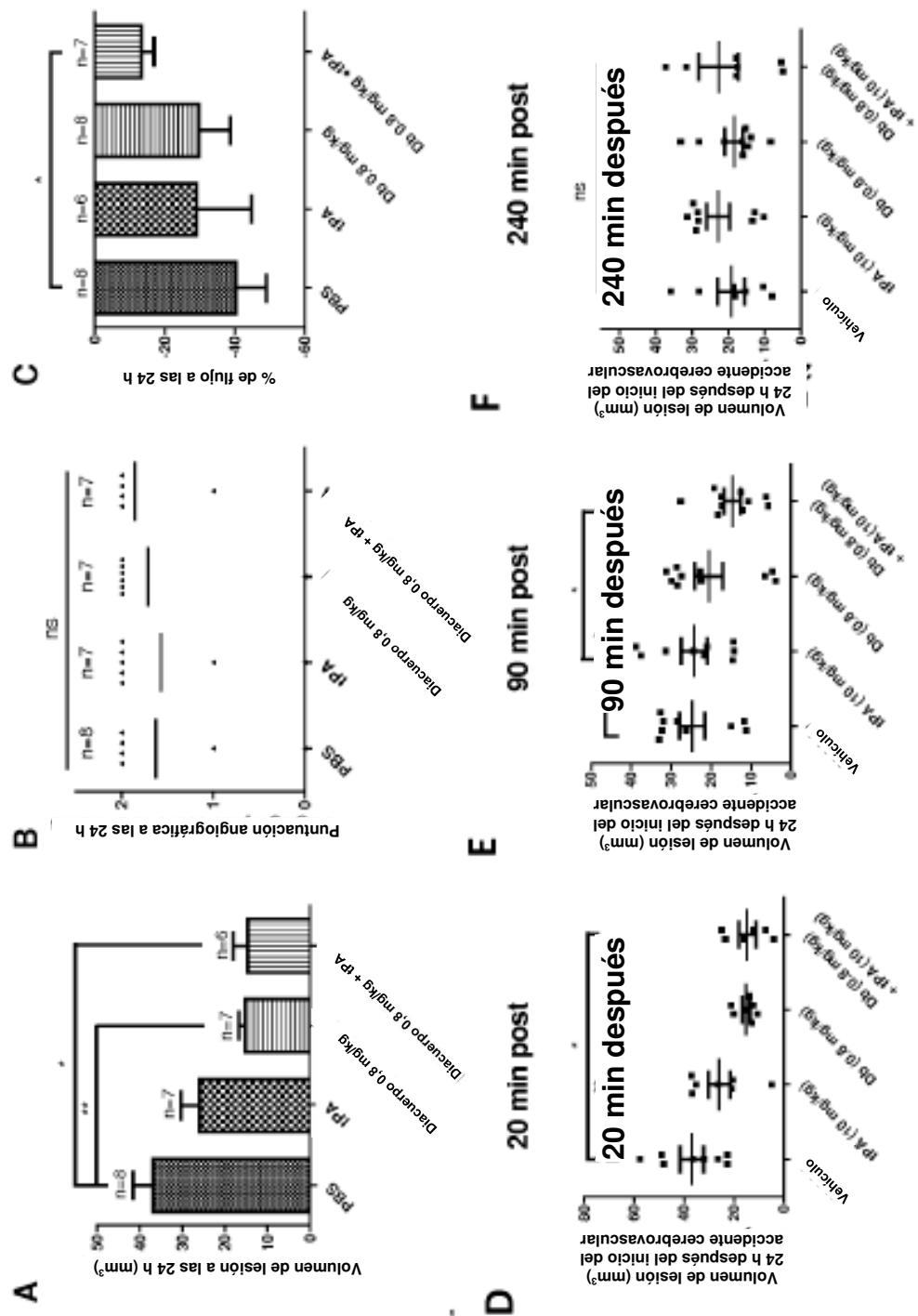


Figura 9

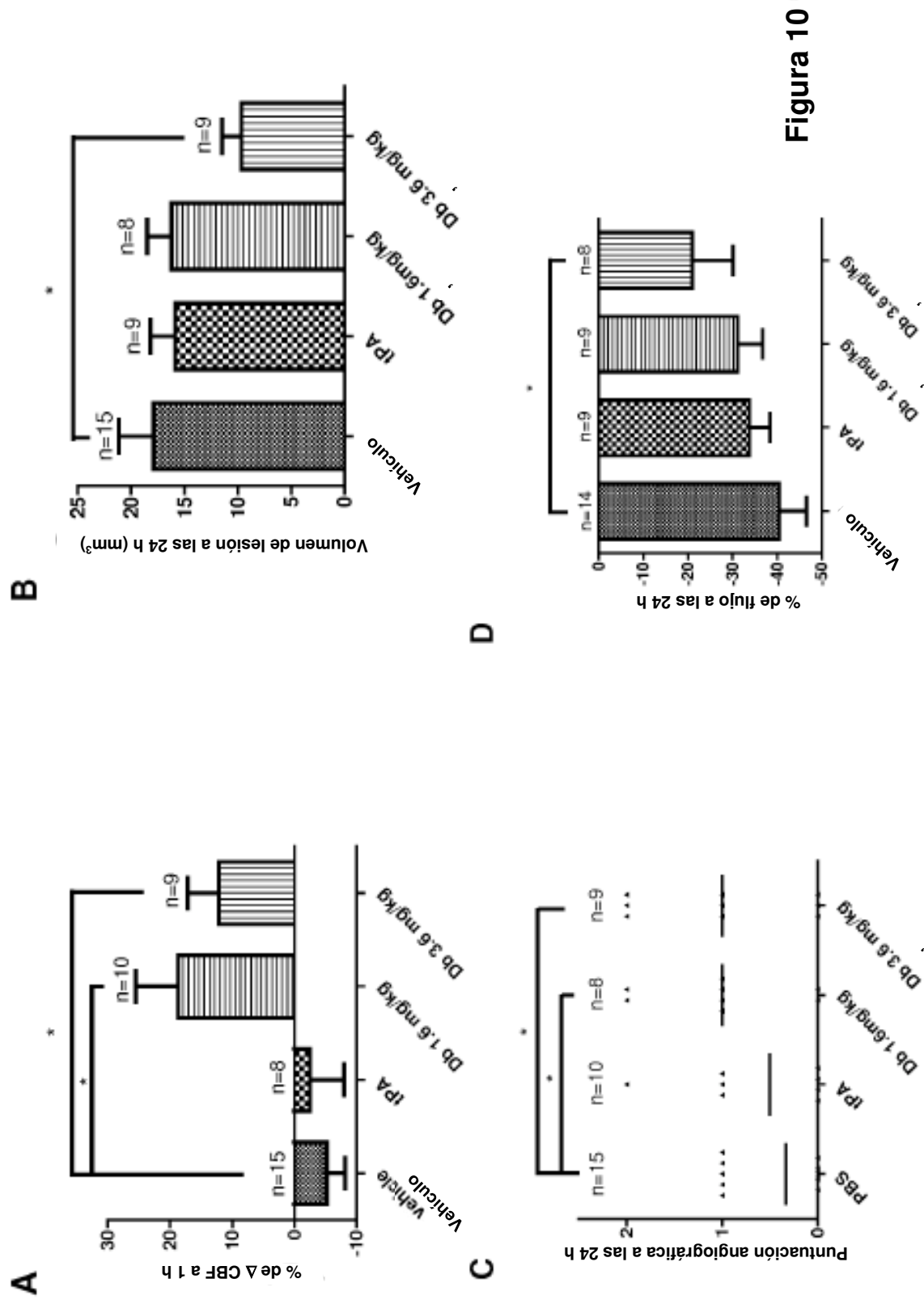


Figura 10

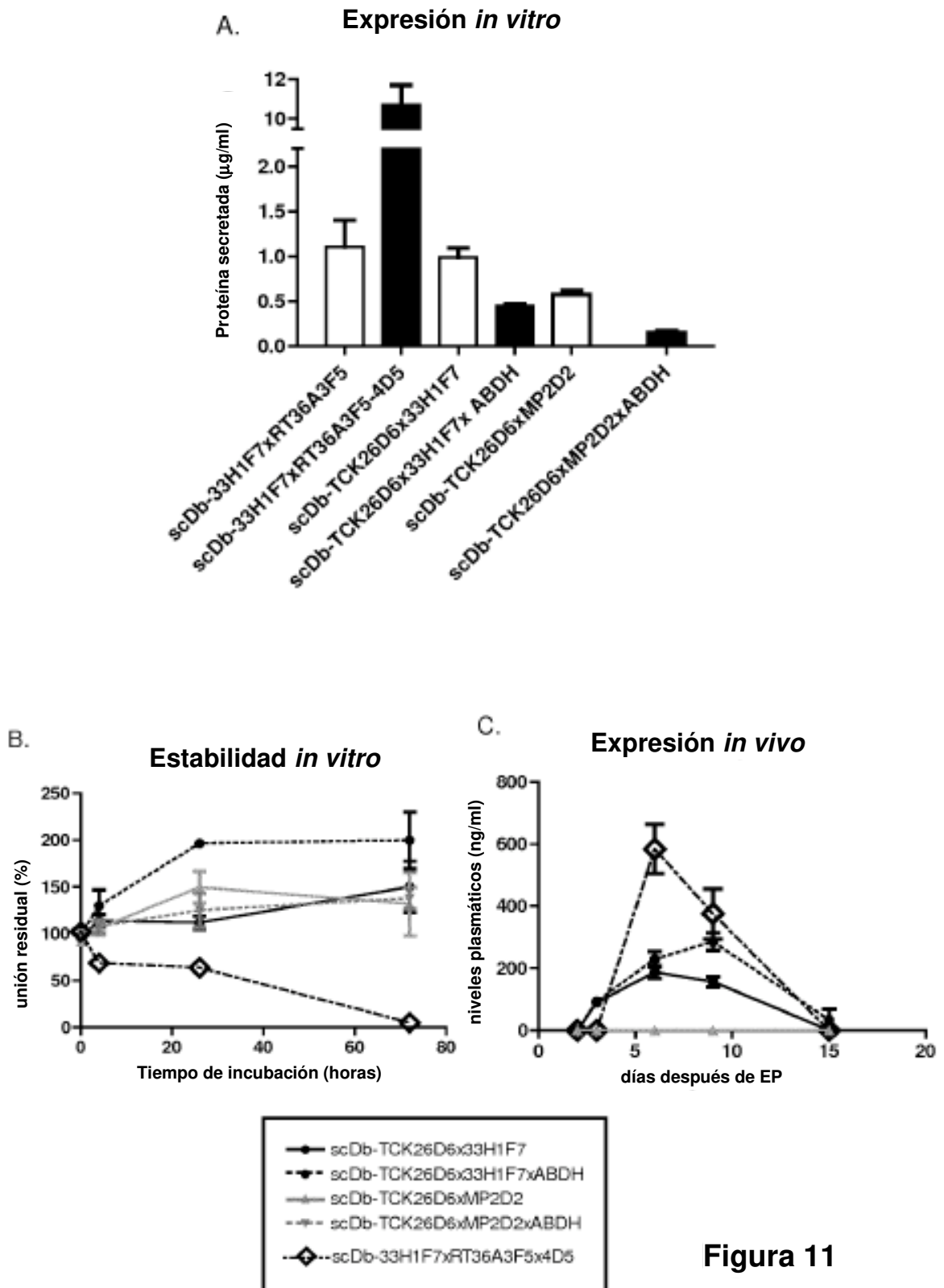


Figura 11

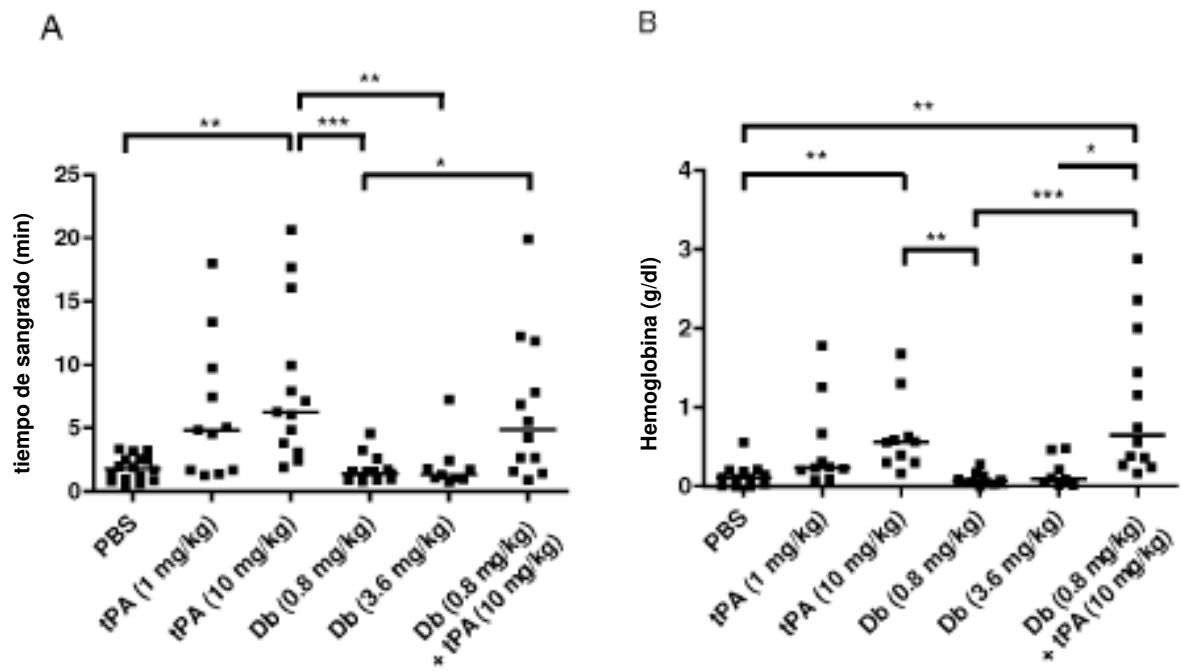


Figura 12

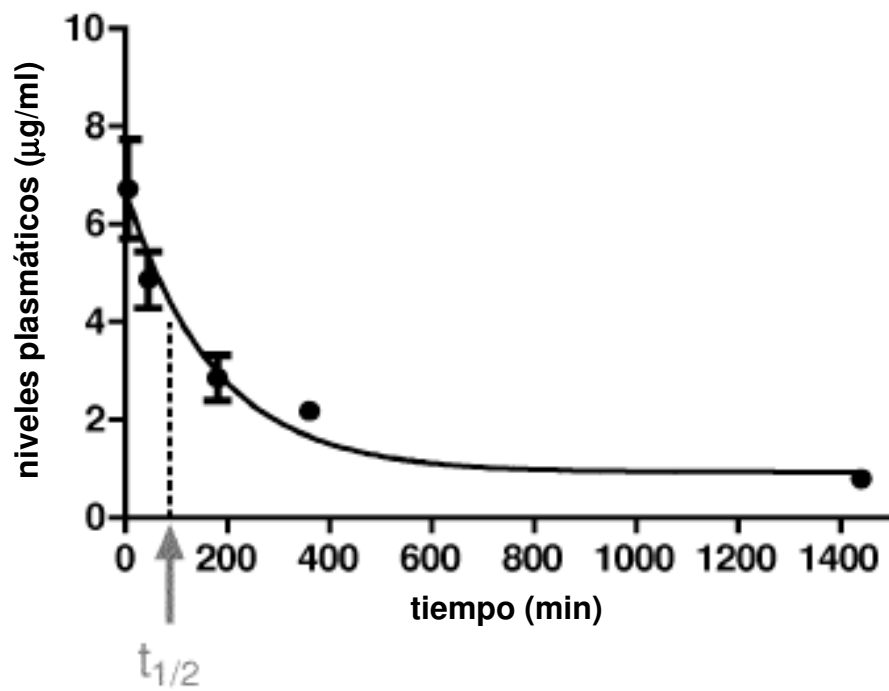


Figura 13

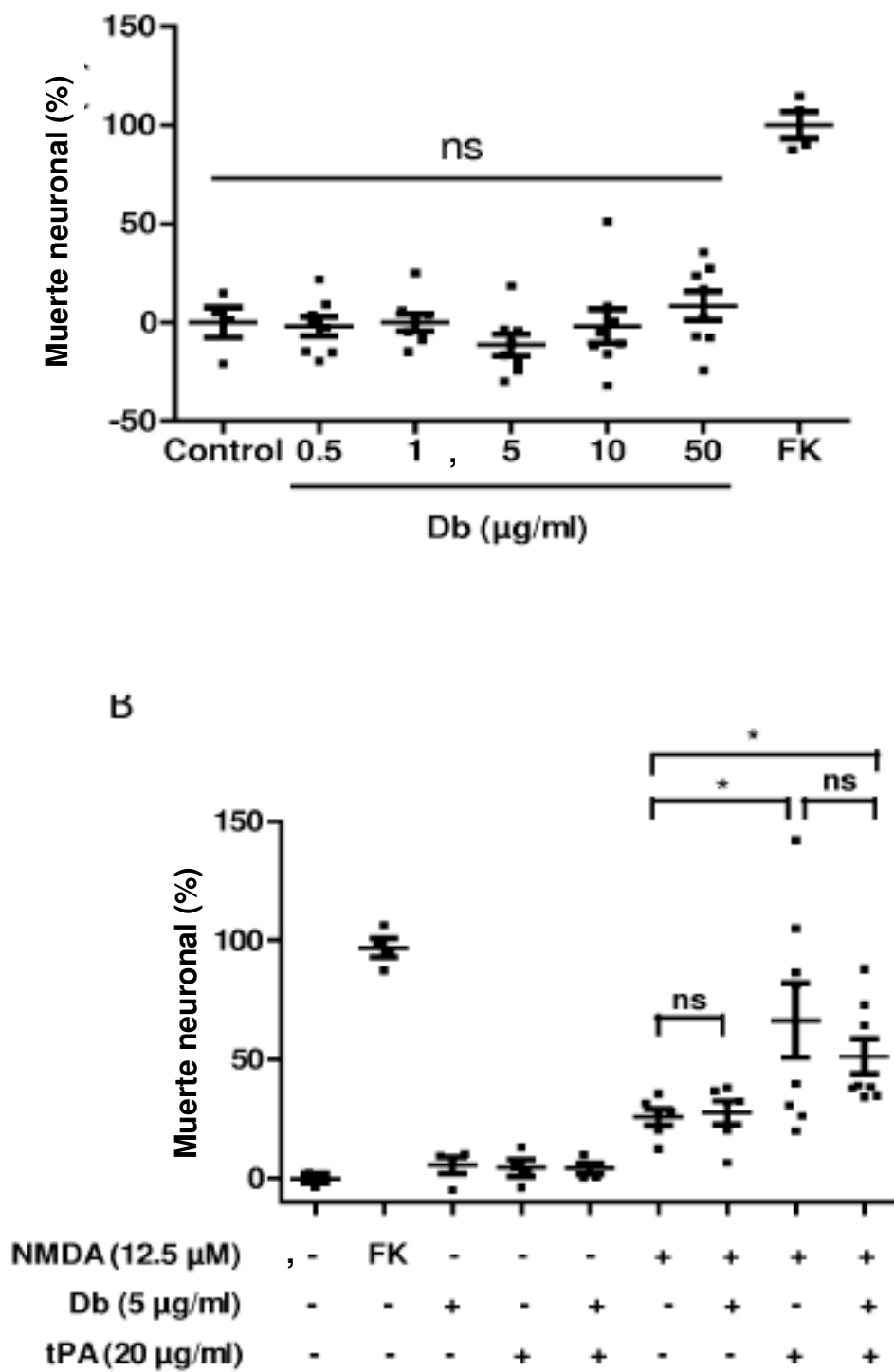


Figura 14