(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 787 512**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/38 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2011 PCT/EP2011/060980**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12001087**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011 E 11729297 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2588499**

(54) Título: **Anticuerpos que son capaces de unirse específicamente al inhibidor de la vía del factor tisular**

(30) Prioridad:

15.04.2011 US 201161475895 P
01.04.2011 EP 11160763
07.07.2010 US 362108 P
30.06.2010 EP 10167911

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2020

(73) Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK

(72) Inventor/es:

HILDEN, IDA;
CLAUSEN, JES THORN;
PETERSEN, LARS CHRISTIAN;
SØRENSEN, BRIT BINOW y
PETERSEN, HELLE HEIBROCH

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 787 512 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que son capaces de unirse específicamente al inhibidor de la vía del factor tisular

Campo de la invención

En la presente se describen anticuerpos que son capaces de unirse específicamente al C-terminal del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y que por lo tanto son capaces de neutralizar el grupo libre de TFPI. También se describen usos para tales anticuerpos, tales como usos terapéuticos y farmacéuticos.

Antecedentes de la invención

En sujetos con una coagulopatía, tales como en seres humanos con hemofilia A y B, diversas etapas de la cascada de coagulación se tornan disfuncionales debido a, por ejemplo, la ausencia o presencia insuficiente de un factor de coagulación. Tal disfunción de una parte de la cascada de coagulación resulta en una coagulación de la sangre insuficiente y sangrados potencialmente mortales, o daño a los órganos internos, tal como las articulaciones. Los sujetos tales como los seres humanos con hemofilia A y B pueden recibir terapia de reemplazo del factor de coagulación tal como Factor VIII o Factor IX exógenos, respectivamente. Sin embargo, tales pacientes corren el riesgo de desarrollar "inhibidores" (anticuerpos) de tales factores exógenos, lo que hace que la terapia anteriormente eficiente sea ineficaz. Además, los factores de coagulación exógenos solo pueden administrarse por vía intravenosa, lo que es un inconveniente y una molestia considerables para los pacientes. Por ejemplo, los infantes y niños pequeños pueden tener que tener catéteres intravenosos insertados quirúrgicamente en una vena torácica, para garantizar el acceso venoso. Esto los deja en gran riesgo de desarrollar infecciones bacterianas y complicaciones trombóticas. Los sujetos con una coagulopatía solo pueden recibir terapia después de que haya comenzado un sangrado, en lugar de como medida de precaución, lo que a menudo afecta su calidad de vida general. Por lo tanto, todavía hay muchas necesidades médicas insatisfechas en la comunidad de hemofilia, en particular, y en los sujetos con coagulopatías, en general.

La cascada de coagulación normalmente se pone en movimiento tras una lesión en la pared del vaso, que expone el factor tisular (TF) subendotelial a los componentes de la sangre circulante. En resumen, el TF forma un complejo con Factor VII/Factor VIIa (FVII/FVIIa) en la superficie de las células que expresan TF. Este complejo activa el Factor X (FX) a Factor Xa (FXa) que, con el Factor Va (FVa) como cofactor, conduce a la generación de una cantidad limitada de trombina (FIIa). Las pequeñas cantidades de trombina activan las plaquetas, lo que resulta en una exposición superficial de fosfolípidos que apoyan la unión del complejo tenasa, Factor VIIIa/Factor IXa (FVIIIa/FIXa). El complejo tenasa activa grandes cantidades de FX a FXa, lo que subsecuentemente resulta en la generación de una gran cantidad de trombina. Se necesita un estallido de trombina completa para la formación de una estructura de fibrina mecánicamente fuerte y la estabilización del tapón hemostático.

En individuos con hemofilia, FVIII o FIX está presente en niveles bajos, o puede estar completamente ausente. Debido a la carencia de actividad tenasa, la capacidad de generar FXa es baja e insuficiente para soportar la fase de propagación de la coagulación. Por el contrario, la fase de iniciación de la coagulación mediada por el TF no depende de la formación del complejo tenasa. Sin embargo, el inicio de la coagulación a través de la vía TF será bloqueado por inhibidores plasmáticos poco después de la generación inicial de FXa. Uno de tales inhibidores es el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), que inhibe tanto FXa como TF/FVIIa y desempeña un papel importante como inhibidor de retroalimentación de la coagulación en curso. TFPI es un fuerte inhibidor del complejo TF-FVIIa solo en presencia de FXa. Por lo tanto, la inhibición eficiente de TF/FVIIa requiere la generación de FXa, la formación del complejo FXa/TFPI y una subsecuente formación del complejo ternario TF/FVIIa/FXa/TFPI.

Existen varios grupos de TFPI *in vivo*. Una fracción mayor se une al endotelio vascular, una fracción menor se asocia con las lipoproteínas en la sangre, una pequeña fracción está presente en las plaquetas y, finalmente, existe una pequeña cantidad como TFPI circulante libre. Además, TFPI existe como formas TFPIalfa, TFPIbeta y TFPIgamma. La neutralización de la actividad inhibitoria de ciertas fracciones de TFPI puede resultar eficiente en el tratamiento de sangrados no deseados.

Los anticuerpos que son capaces de unirse a TFPI se conocen en la técnica. Varios documentos describen anticuerpos que son capaces de unirse al dominio K3 de TFPI, a saber:

- J. Biochem, 1995, 118 (1): 178-182.
- Blood Coagul. Fibrinolyis, 1999, 10 (6): 309-19.
- JP6153981A.

Estas referencias no describen anticuerpos contra TFPI para el tratamiento de sujetos con una coagulopatía.

Todavía existe una necesidad en la técnica de la medicina de productos farmacéuticos que puedan usarse para potenciar la coagulación. Existe la necesidad de productos farmacéuticos que puedan administrarse no solo por vía intravenosa sino también por otras vías de administración, como por vía subcutánea. Por lo tanto, existe la necesidad de productos farmacéuticos, tal como anticuerpos, que sean procoagulantes incluso cuando se administren en dosis bajas y/o que tengan una alta biodisponibilidad. Además, existe la necesidad de productos farmacéuticos, tal como anticuerpos, que sean adecuados para el tratamiento profiláctico de personas con una coagulopatía congénita o adquirida, tal como hemofilia A, hemofilia B, hemofilia A con inhibidores o hemofilia B con inhibidores. Más específicamente, existe una necesidad de productos farmacéuticos, tales como anticuerpos, que bajen el umbral para la actividad de FVIII o FIX en individuos con hemofilia A y hemofilia B, respectivamente. Dentro del ámbito particular de los anticuerpos que son capaces de unirse al TFPI, existe la necesidad de anticuerpos que no se unan a todos los grupos de TFPI, tal como anticuerpos que no afectan la función del TFPI unido a las células endoteliales, tal como el grupo de TFPI anclado a GPI. Más específicamente, existe la necesidad de anticuerpos contra TFPI que demuestren linealidad de dosis con relación a su vida media en plasma.

En la presente descripción se describen anticuerpos que son adecuados para su uso como productos farmacéuticos. Tales anticuerpos pueden tener un impacto sustancial en la calidad de vida de, no menos importante, las personas con hemofilia A o B, con o sin inhibidores.

Breve descripción de la invención

En la presente descripción se describen anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse específicamente al C-terminal del inhibidor de longitud completa de la vía del factor tisular (TFPI), en donde "C-terminal" se define en la presente descripción como la porción del TFPI que es, o que corresponde a, los residuos de amino ácidos 186-276 del TFPI humano de longitud completa (SEQ ID NO: 1). La presente invención se refiere a tales anticuerpos y a otros anticuerpos que se derivan de estos anticuerpos y/o que tienen propiedades de unión similares y que son capaces de modular la actividad del TFPI libre.

Un anticuerpo de la invención se une específicamente dentro de los aminoácidos 186-276 del TFPI (SEQ ID NO: 1) y tiene una cadena pesada que comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (SYYMY) de la SEQ ID NO: 5 y
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (EINPSNGDTNLNEKFKS) de la SEQ ID NO: 5 y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-107 (WDRFDGFVY) de la SEQ ID NO: 5;

y una cadena ligera que comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-34 (IISTNIDDDIN) de la SEQ ID NO: 7 y
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-56 (EGNTLRP) de la SEQ ID NO: 7 y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 89-97 (LQSDDLPYT) de la SEQ ID NO: 7.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser capaces de unirse específicamente a los residuos seleccionados del grupo que consiste en P186, S187, L190, P192, A193, D194, R195, G196, L197, C198, R199, A200, N201, E202, N203, R204, F205, Y206, Y207, N208, K213, R215, P216, F217, K218, Y219, S220, N225, E226, N227, N228, T230, S231, K232, Q233, E234, L236, R237, K240, K241, G242, F243, I244, Q245, R246, I247, S248, K249, G250, G251, L252, I253, K254, T255, K256, R257, K258, R259, K260, K261, Q262, R263, V264, K265, I266, A267, Y268, E269, E270, I271, F272, V273, K274, N275 y M276 de la SEQ ID NO: 1.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser capaces de unirse específicamente a los residuos seleccionados del grupo que consiste en P186, S187, L190, P192, A193, D194, R195, G196, L197, C198, R199, A200, N201, E202, N203, R204, F205, Y206, Y207, N208, K213, R215, P216, F217, K218, Y219, S220, N225, E226, N227, N228, T230, S231, K232, Q233, E234, L236 y R237 de la SEQ ID NO: 1.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser capaces de unirse específicamente a los residuos seleccionados del grupo que consiste en K240, K241, G242, F243, I244, Q245, R246, I247, S248, K249, G250, G251, L252, I253, K254, T255, K256, R257, K258, R259, K260, K261, Q262, R263, V264, K265, I266, A267, Y268, E269, E270, I271, F272, V273, K274, N275 y M276 de la SEQ ID NO: 1.

Un anticuerpo particular comprende la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 5. Otro anticuerpo particular comprende la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 11. Un tercer anticuerpo particular

comprende la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 13 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 15.

También se describen polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en la presente descripción, tales como polinucleótidos que codifican una cadena ligera del anticuerpo y/o una cadena pesada de anticuerpo descritas en la presente descripción.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o polinucleótido como se describe en la presente descripción y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos, polinucleótidos y composiciones descritos en la presente descripción también se proporcionan para su uso en el tratamiento o prevención de una coagulopatía o la estimulación de la coagulación de la sangre. Es decir, la invención proporciona un método para el tratamiento o prevención de una coagulopatía, o la estimulación de la coagulación de la sangre, dicho método que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo, polinucleótido o composición descrita en la presente descripción.

Breve descripción del listado de secuencias

La SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI humano de longitud completa (secuencia del péptido señal omitida).

La SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI truncado (1-239).

La SEQ ID NO: 3 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI truncado (1-245).

La SEQ ID NO: 4 proporciona la secuencia de ácido nucleico (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable pesado (VH) del anti-TFPI4F110 (también designado mAb 4F110).

La SEQ ID NO: 5 proporciona la secuencia de aminoácidos (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable pesado (VH) del anti-TFPI4F110.

La SEQ ID NO: 6 proporciona la secuencia de ácido nucleico (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable ligero (VL) del anti-TFPI4F110.

La SEQ ID NO: 7 proporciona la secuencia de aminoácidos (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable ligero (VL) del anti-TFPI4F110.

La SEQ ID NO: 8 proporciona la secuencia de ácido nucleico (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable pesado (VH) del anti-TFPI22F66.

La SEQ ID NO: 9 proporciona la secuencia de aminoácidos (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable pesado (VH) del anti-TFPI22F66.

La SEQ ID NO: 10 proporciona la secuencia de ácido nucleico (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable ligero (VL) del anti-TFPI22F66.

La SEQ ID NO: 11 proporciona la secuencia de aminoácidos (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable ligero (VL) del anti-TFPI22F66.

La SEQ ID NO: 12 proporciona la secuencia de ácido nucleico (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable pesado (VH) del anti-TFPI22F71.

La SEQ ID NO: 13 proporciona la secuencia de aminoácidos (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable pesado (VH) del anti-TFPI22F71.

La SEQ ID NO: 14 proporciona la secuencia de ácido nucleico (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable ligero (VL) del anti-TFPI22F71.

La SEQ ID NO: 15 proporciona la secuencia de aminoácidos (secuencia del péptido señal omitida) del dominio variable ligero (VL) del anti-TFPI22F71.

La SEQ ID NO: 16 proporciona la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso que se usó para la amplificación de la HC (dominio VH).

La SEQ ID NO: 17 proporciona la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso que se usó para la amplificación de la LC (dominio VL) de TFPI22F66 y TFPI22F71**.**

La SEQ ID NO: 18 proporciona la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso que se usó para la amplificación de la LC de TFPI4F110 .

La SEQ ID NO: 19 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor VII/Factor VIIa.

La SEQ ID NO: 20 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor VIII.

La SEQ ID NO: 21 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor IX.

La SEQ ID NO: 22 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI truncado (1-240).

La SEQ ID NO: 23 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI truncado (1-241).

La SEQ ID NO: 24 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI truncado (1-242).

La SEQ ID NO: 25 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI truncado (1-243).

La SEQ ID NO: 26 proporciona la secuencia de aminoácidos del TFPI truncado (1-244).

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto del anticuerpo 4F110 TFPI sobre la formación de coágulos inducida por TF. El tiempo de coagulación se midió con un ensayo de PT diluido a varias concentraciones fijas de TF (Innovin® diluido 1:7500; 1:15 000; 1:30 000) y anticuerpo (0,005 - 1 nM).

La Figura 2 muestra el efecto de 4F110 anti-TFPI sobre la generación de trombina inducida por TF en plasma empobrecido en FVIII. La coagulación se inició mediante calcificación y adición de Innovin® (fuente de TF) a plasma empobrecido en FVIII citratado, suplementado con PS/PC 10 µM en ausencia y presencia de 10 nM de 4F110.

La Figura 3 muestra el efecto de 4F110 anti-TFPI sobre la generación de trombina inducida por TF en plasma empobrecido en FVIII relleno de varios niveles de rFVIII. La coagulación se inició mediante calcificación y adición de Innovin® (fuente de TF) a plasma empobrecido en FVIII citratado, suplementado con PS/PC 10 µM en ausencia y presencia de 10 nM de 4F110. Las barras muestran los tiempos de retraso correspondientes calculados en base a un nivel umbral de trombina de 1 nM (significa ± SD, n = x).

La Figura 4 muestra el efecto de 4F110 anti-TFPI y rFVIII sobre la formación de coágulos inducida por TF en plasma empobrecido en FVIII suplementado con 150 000 plaquetas/µl medido por análisis de tromboelastografía (TEG). **A**. Las curvas de TEG muestran el efecto de añadir 0,005, 0,05 y 1,0 U/ml de rFVIII al plasma empobrecido en FVIII en ausencia de anti-TFPI. **B**. Las curvas de TEG muestran el efecto de añadir 0,005, 0,05 y 1,0 U/ml de rFVIII al plasma empobrecido en FVIII en presencia de 10 nM de 4F110 anti-TFPI **C**. Los valores de R (tiempos de coagulación) para las curvas sin AB se muestran en A (barras abiertas) y con AB en B (barras cerradas). **D**. Los valores de K (velocidad de la cinética del coágulo) para las curvas sin AB se muestran en A (barras abiertas) y con AB en B (barras cerradas). **E**. Los valores de ángulo para las curvas sin AB se muestran en A (barras abiertas) y con AB en B (barras cerradas). **F**. Los valores de MA (amplitud máxima) para las curvas sin AB se muestran en A (barras abiertas) y con AB en B (barras cerradas).

La Figura 5 muestra el análisis de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de una línea celular que expresa TFPI.Como también se ilustra en la figura 6, los dos anticuerpos monoclonales C-terminales no pudieron unirse al TFPI sobre una superficie celular.

La Figura 6 muestra que los anticuerpos contra TFPI C-terminales denominados 4F110, 22F66, 22F71, 22F74, 22F79 y 22F132 no se unen o se unen muy poco al TFPI truncado (1-239) (las cinco barras centrales).

La Figura 7 muestra que seis anticuerpos contra TFPI (4F110, 22F66, 22F71, 22F132, 22F79, 22F74) se unen a diferentes formas truncadas de TFPI, enumeradas a la derecha. La unión es relativa a la unión al TFPI de tipo salvaje (wt) (1,0).

La Figura 8 muestra la neutralización de la inhibición de TFPI de la actividad de FVIIa/TF/FXa en presencia de vesículas de fosfolípidos (PS/PC). Círculo abierto: 4F110; círculo lleno 22F66; cuadrado: 22F71; triángulo gris: 22F79; triángulo abierto: 22F74; rombo gris: 22F132.

La Figura 9 es una caricatura de la estructura de TFPI y los diversos grupos de TFPI.

Descripción de la invención

La invención se refiere a anticuerpos que son capaces de unirse específicamente al inhibidor de la vía del factor tisular de longitud completa (TFPI), tal como los anticuerpos que se unen al "C-terminal" de TFPI. Tales anticuerpos pueden unirse específicamente al dominio C-terminal y/o al dominio Kunitz 3 (K3) de TFPI; es decir, pueden unirse al "C-terminal" pero no pueden unirse al dominio Kunitz 1 (K1) de TFPI, el dominio Kunitz 2 (K2) de TFPI o a otras moléculas similares. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden no unirse a una molécula de TFPI que comprende el dominio K1 y/o K2 pero que carece esa porción de TFPI que es de C-terminal al dominio K2. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser incapaces de unirse a TFPI truncado, tal como TFPI truncado en el C-terminal. Las formas truncadas de TFPI que pueden no unirse por los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos 1 a 161 de la SEQ ID NO: 1. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse al dominio K1 de TFPI, al dominio K2 de TFPI o a otras moléculas tales como moléculas de TFPI truncadas, con una baja afinidad en comparación con la que se unen al C-terminal de TFPI.

El término “TFPI”, como se usa en la presente descripción, abarca cualquier forma de TFPI de origen natural que puede derivarse de cualquier organismo adecuado. Por ejemplo, el TFPI para usar como se describe en la presente descripción puede ser TFPI de vertebrado, tal como TFPI de mamífero, tal como TFPI de un primate (tal como un humano); un roedor (tal como un ratón o una rata), un lagomorfo (tal como un conejo), o un artiodáctilo (tal como una vaca, oveja, cerdo o camello). Preferentemente, el TFPI es TFPI humano. El TFPI puede ser una forma madura de TFPI tal como una proteína TFPI que experimentó el procesamiento postraduccional dentro de una célula adecuada. Tal proteína TFPI madura puede, por ejemplo, estar glicosilada. El TFPI puede ser una proteína TFPI de longitud completa. El término TFPI abarca, además, variantes, isoformas y otros homólogos de tales moléculas de TFPI. Las variantes de moléculas de TFPI pueden tener el mismo tipo de actividad que el TFPI de origen natural, tal como la capacidad de neutralizar la actividad catalítica del FXa, o la capacidad de inhibir un complejo de TF-FVIIa/FXa.

El término "C-terminal", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier parte de TFPI que es C-terminal al residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 187 del TFPI humano (SEQ ID NO: 1). El término "C-terminal" excluye específicamente los dominios Kunitz 1 (K1) y Kunitz 2 (K2) de TFPI. Por otro lado, el término "C-terminal" incluye partes de TFPI que están dentro del dominio Kunitz 3 (K3) de TFPI (aminoácidos 188-238) y/o partes de TFPI que incluyen los aminoácidos 240-276.

"TFPI libre" es el grupo de TFPI *in vivo* que contiene un "C-terminal" disponible. El término "TFPI libre" se refiere al grupo soluble de TFPI en plasma. Otros grupos de TFPI, que no son "TFPI libre", son TFPI anclado a GPI y TFPI unido a lipoproteína. A diferencia del TFPI libre, estos grupos de TFPI no tienen un C-terminal que esté disponible para unirse a, por ejemplo, un anticuerpo. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser capaces de unirse específicamente a TFPI libre, pero pueden no ser capaces de unirse específicamente aTFPI anclado a GPI. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser capaces de unirse específicamente a TFPI libre, pero pueden no ser capaces de unirse específicamente aTFPI unido a lipoproteína.

Por lo tanto, la invención se refiere a anticuerpos que pueden ser capaces de modular solamente la actividad de TFPI libre. Tales anticuerpos pueden poseer la capacidad de acortar el tiempo de coagulación. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente descripción puede tener la capacidad de acortar el tiempo de coagulación en plasma humano deficiente en FVIII o plasma humano deficiente en FIX, o reducir el tiempo de coagulación medido en un análisis de tromboelastografía (TEG) de sangre completa humana.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser anticuerpos monoclonales en el sentido de que están formados por células inmunes idénticas que son todos clones de la misma célula parental. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden producirse, cribarse y purificarse mediante el uso de los métodos descritos en los Ejemplos. Los anticuerpos descritos en la presente descripción también pueden producirse por medio de otros métodos conocidos por el experto en la técnica, tales como una presentación en fago o una presentación en levadura. Una vez producidos, los anticuerpos pueden cribarse para unirse a, por ejemplo, TFPI de longitud completa, TFPI truncado (1-161), TFPI truncado (1-239), TFPI truncado (1-240), TFPI truncado (1-241), TFPI truncado (1-242), TFPI truncado (1-243), TFPI truncado (1-244), TFPI truncado (1-245) y TFPI truncado (1-246) mediante el uso de los métodos descritos en los Ejemplos.

El término “anticuerpo”, en la presente descripción, se refiere a una proteína, derivada a partir de una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno, o una porción de este. El término incluye anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo (es decir, IgA, IgE, IgG, IgM y/o IgY) y cualquier cadena simple de estos.

El término "anticuerpo", como se menciona en la presente descripción, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (*es decir*, "porción de unión a antígeno") o cadenas simples de estos. Un anticuerpo se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) que están interconectadas por enlaces disulfuro; o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada se compone por una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada

cadena ligera se compone por una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, lo que incluye diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

Los ejemplos de tales fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, FAbS, Fv (típicamente, los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo), Fv de cadena única (scFv; ver por ejemplo, Bird y otros, Science 1988; 242:42S-426; y Huston y otros PNAS 1988; 85:5879-5883), dsFv, Fd (típicamente, los dominios VH y CHI) y los fragmentos dAb (típicamente un dominio VH); los dominios VH, VL, VHh, y V-NAR; las moléculas monovalentes que comprenden una única cadena VH y una única cadena VL; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y cuerpos kappa (ver, por ejemplo, Ill y otros. Protein Eng 1997;10:949-57); IgG de camello; IgNAR; así como también una o más CDR aisladas o un parátopo funcional, donde las CDR aisladas o los residuos o polipéptidos de unión a antígeno pueden asociarse o unirse juntos para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Diversos tipos de fragmentos de anticuerpos se han descrito o revisado, por ejemplo, Holliger y Hudson, Nat Biotechnol 2005; 2S:1126-1136; Documento WO2005040219, y las solicitudes de Patente de EE.UU. publicadas 20050238646 y 20020161201.

Los "fragmentos Fab", que incluye los fragmentos "Fab" y "$F(ab')_2$" de un anticuerpo, se derivan de dicho anticuerpo por escisión de la cadena pesada en la región de bisagra en el extremo N-terminal o el lado C-terminal de los residuos de cisteína de la bisagra que conectan las cadenas pesadas del anticuerpo. Un fragmento "Fab" incluye los dominios variable y constante de la cadena ligera y el dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos "$F(ab')_2$" comprenden un par de fragmentos "Fab" que se unen generalmente covalentemente por sus cisteína de la bisagra. Un Fab' se deriva formalmente de un fragmento $F(ab')_2$ mediante escisión de los enlaces disulfuro de la bisagra que conectan las cadenas pesadas en el $F(ab')_2$. Además, en la técnica se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos diferentes de los enlaces disulfuro. Un fragmento Fab conserva la capacidad del anticuerpo parental para unirse a su antígeno, potencialmente con una afinidad más baja. Los fragmentos $F(ab')_2$ son capaces de uniones divalentes, mientras que los fragmentos Fab y Fab' pueden unirse de manera monovalente. Generalmente, los fragmentos Fab carecen de los dominios constantes CH2 y CH3, es decir la parte Fc, donde ocurriría la interacción con los receptores Fc. Por lo tanto, los fragmentos Fab en general carecen de funciones efectoras. Los fragmentos Fab pueden producirse mediante métodos conocidos en la técnica, ya sea mediante escisión enzimática de un anticuerpo, por ejemplo, mediante el uso de papaína para obtener el Fab o pepsina para obtener el $F(ab')_2$, o los fragmentos Fab pueden producirse de manera recombinante mediante el uso de técnicas bien conocidas por el experto en la técnica.

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión al antígeno y comprende generalmente un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en un fragmento del dominio variable de cadena simple (scFv). Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables o un subconjunto de estas confieren la especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque usualmente a una afinidad menor que la del sitio de unión completo (Cai y Garen, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 93:6280-6285, 1996). Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos de origen natural que sólo tienen un dominio variable de cadena pesada (VHH) pueden unirse al antígeno (Desmyter y otros, *J. Biol. Chem.*, 277:23645-23650, 2002; Bond y otros, *J. Mol. Biol*. 2003; 332:643-655).

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena simple" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende, además, un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver Pluckthun, 1994, En: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,* Vol. 113, Ed. Rosenburg y Moore. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígenos, en los que los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH y VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios variables en la misma cadena, los dominios variables se fuerzan a aparearse con dominios complementarios de otra cadena, lo que crea dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.,* 90:6444-6448.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a anticuerpos como se describe en Zapata y otros, 1995, *Protein Eng*., 8(10):1057-1062. Brevemente, estos anticuerpos contienen un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1)

que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El término “monocuerpo”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula de unión a antígeno con un dominio variable de cadena pesada y ningún dominio variable de cadena ligera. Un monocuerpo puede unirse a un antígeno en ausencia de cadenas ligeras y tiene típicamente tres regiones hipervariables, por ejemplo, las CDR denominadas CDRH1, CDRH2, y CDRH3. Un monocuerpo de cadena pesada de IgG tiene dos moléculas de unión a antígeno de cadena pesada conectadas mediante un enlace disulfuro. El dominio variable de cadena pesada comprende una o más regiones hipervariables, preferentemente, una región CDRH3 o HVL-H3.

Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse mediante el uso de técnicas convencionales de ingeniería recombinante o proteica, y los fragmentos pueden cribarse por la unión a TFPI de longitud completa, TFPI truncado (1-161), TFPI truncado (1-239), TFPI truncado (1-240), TFPI truncado (1-241), TFPI truncado (1-242), TFPI truncado (1-243), TFPI truncado (1-244), TFPI truncado (1-245) y TFPI truncado (1-246) de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de anticuerpos pueden hacerse mediante truncamiento, por ejemplo, mediante la eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos N y/o C-terminal de un polipéptido. Los fragmentos pueden generarse, además, mediante una o más deleciones internas.

El anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser, o puede comprender, un fragmento del anticuerpo MuTFPI4F110, el anticuerpo MuTFPI22F66, el anticuerpo MuTFPI22F71, el anticuerpo MuTFPI 22F74, el anticuerpo MuTFPI 22F79, el anticuerpo MuTFPI 22F132 o una variante de cualquiera de estos anticuerpos. El anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser, o puede comprender, una porción de unión a antígeno de uno de estos anticuerpos, o variantes de los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un fragmento Fab de uno de estos anticuerpos o variantes de los mismos, o puede ser un anticuerpo de cadena sencilla derivado de uno de estos anticuerpos, o una variante de los mismos.

El anticuerpo MuTFPI4F110 tiene una secuencia de cadena pesada variable como se muestra en la SEQ ID NO: 5 y una secuencia de cadena ligera variable como se muestra en la SEQ ID NO: 7. Un anticuerpo de la invención puede comprender esta secuencia de cadena pesada variable y/o esta secuencia de cadena ligera variable. El anticuerpo MuTFPI4F110 tiene las secuencias de CDR que se muestran en los residuos de aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 107 de la SEQ ID NO: 5 y los residuos de aminoácidos 24 a 34, 50 a 56 y 89 a 97 de la SEQ ID NO: 7. Un anticuerpo de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR. Un anticuerpo de la invención puede comprender los residuos de aminoácidos 99 a 107 de la SEQ ID NO: 5.

El anticuerpo MuTFPI22F66 tiene una secuencia de cadena pesada variable como se muestra en la SEQ ID NO: 9 y una secuencia de cadena ligera variable como se muestra en la SEQ ID NO: 11. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden comprender esta secuencia de cadena pesada variable y/o esta secuencia de cadena ligera variable. El anticuerpo MuTFPI22F66 tiene las secuencias de CDR que se muestran en los residuos de aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 106 de la SEQ ID NO: 9 y los residuos de aminoácidos 24 a 33, 49 a 55 y 88 a 96 de la SEQ ID NO: 11. Los anticuerpos pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR. Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede comprender los residuos de aminoácidos 99 a 106 de la SEQ ID NO: 9.

El anticuerpo MuTFPI22F71 tiene una secuencia de cadena pesada variable como se muestra en la SEQ ID NO: 13 y una secuencia de cadena ligera variable como se muestra en la SEQ ID NO: 15. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden comprender esta secuencia de cadena pesada variable y/o esta secuencia de cadena ligera variable. El anticuerpo MuTFPI22F71 tiene las secuencias de CDR que se muestran en los residuos de aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 111 de la SEQ ID NO: 13 y los residuos de aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de la SEQ ID NO: 15. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 de estas secuencias de CDR. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden comprender los residuos de aminoácidos 99 a 111 de la SEQ ID NO: 13.

Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (*por ejemplo,* mutaciones *in vitro,* introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio, o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Tal anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Tal anticuerpo monoclonal humano puede producirse mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón, rata o conejo transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

Los anticuerpos humanos pueden aislarse a partir de bibliotecas de secuencias incorporadas en selecciones de secuencias de líneas germinales humanas, diversificadas adicionalmente con una diversidad de secuencias natural y sintética.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido de transformación de los linfocitos con el virus Epstein-Barr.

El término “derivados de anticuerpos humanos” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término "anticuerpo humanizado" pretende referirse a un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene una secuencia mínima (regiones CDR) derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados son, por lo tanto, inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de un ratón, rata, conejo, o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Un ejemplo de tal modificación es la introducción de una o más de las llamadas mutaciones inversas.

El término “derivado de anticuerpo humanizado” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humanizado, tal como un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el comportamiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos de los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos de los residuos de FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede opcionalmente comprender además al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente, la de una inmunoglobulina humana.

La región “cristalizable del fragmento” (“región Fc”/“dominio Fc”) de un anticuerpo es la región N-terminal de un anticuerpo, que comprende los dominios constantes CH2 y CH3. El dominio Fc puede interactuar con receptores de la superficie celular denominados receptores Fc, así como también con algunas proteínas del sistema del complemento. La región Fc permite que los anticuerpos interactúen con el sistema inmune. En un aspecto, los anticuerpos se pueden diseñar para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más de sus propiedades funcionales, tales como la vida media en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc, la estabilidad de la proteína y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno, o falta de ella, entre otras. Además, un anticuerpo puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Preferentemente, un dominio Fc modificado comprende una o más, y quizás todas las siguientes mutaciones que resultarán en una menor afinidad por determinados receptores Fc (L234A, L235E, y G237A) y en una disminución de la fijación del complemento mediada por C1q (A330S y P331S), respectivamente (numeración de residuos de acuerdo con el índice de la EU).

En un aspecto, los anticuerpos se pueden diseñar para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más de propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la vida media en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc, la estabilidad de la proteína y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno, o falta de ella. Además, un anticuerpo puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

El isotipo de un anticuerpo de la invención puede ser IgG, tal como IgG1, tal como IgG2, tal como IgG4. Si se desea, la clase de un anticuerpo se puede "cambiar" mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, un anticuerpo que se produjo originalmente como una molécula IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG. Las técnicas de cambio de clase pueden usarse, además, para convertir una subclase de IgG a otra, por ejemplo: de IgG1 a IgG2 o IgG4; de IgG2 a IgG1 o IgG4; o de IgG4 a IgG1 o IgG2. Además, puede realizarse la modificación genética de los anticuerpos para generar moléculas quiméricas de región constante, mediante combinación de regiones de diferentes subclases de IgG.

En una modalidad, la región de bisagra de CHI se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región de bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos núm. 5,677,425 de Bodmer y otros.

La región constante puede modificarse además para estabilizar el anticuerpo, por ejemplo, para disminuir el riesgo de que un anticuerpo bivalente se separe en dos fragmentos monovalentes de VH-VL. Por ejemplo, en una región constante de IgG4, el residuo S241 puede mutarse a un residuo de prolina (P) para permitir la formación de puente disulfuro en la bisagra (ver, por ejemplo, Angal y otros, Mol. Immunol. 199S; 30:105-8).

Un anticuerpo de la invención tendrá la capacidad de unirse a TFPI. Un anticuerpo de la invención es, preferentemente, capaz de unirse específicamente al C-terminal de TFPI. Es decir, es capaz de unirse al C-terminal de TFPI con una mayor afinidad de unión que aquella con la que se une al dominio K1 de TFPI, al dominio K2 de TFPI o a otra molécula.

La molécula diana de un anticuerpo de la invención puede ser cualquier molécula de TFPI como se describe en la presente descripción, tal como una molécula de TFPI de origen natural, una molécula de TFPI completamente madura o una molécula de TFPI de longitud completa. La molécula de TFPI puede estar en una forma que está presente *in vivo*. La molécula diana puede ser TFPI en una forma que está presente en el plasma *in vivo*. El anticuerpo de la invención puede ser capaz de discriminar entre las diversas formas de origen natural de TFPI, uniéndose a algunas pero no a otras. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden no ser capaces de unirse a formas truncadas de TFPI de origen natural que no comprenden un dominio K3 y/o un dominio carboxi terminal. Sin embargo, la molécula diana puede ser una molécula TFPI truncada que comprende un dominio K3 y/o un carboxi terminal. La molécula diana puede ser una variante o un fragmento de una molécula de TFPI. La molécula diana puede consistir en, o puede comprender, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento u otra variante de la misma. Las moléculas diana comprenden un epítopo adecuado para la unión de anticuerpos, tal como el epítopo descrito en la presente descripción.

La molécula diana puede comprender cinco o más, diez o más, quince o más, veinte o más, veinticinco o más, o treinta o más residuos accesibles de la superficie de TFPI o de una región particular de TFPI, tal como el dominio K3 o el C-terminal de TFPI. Un residuo accesible de la superficie es un residuo que tiene más del 40 % de accesibilidad relativa.

Los métodos para medir la accesibilidad a la superficie son bien conocidos en la técnica, habiendo sido descritos primero por Lee & Richards en 1971 [B. Lee y FM Richards, "The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility" J. Mol. Biol. 55, 379-400 (1971)]. Las accesibilidades a la superficie pueden calcularse con el uso del programa de computadora Quanta 2005, de Accelrys Inc., mediante el uso de las coordenadas atómicas que se originan, por ejemplo, de estructuras de rayos X o estructuras construidas por homología.

El término “afinidad de unión” se usa en la presente descripción como una medida de la fortaleza de una interacción no covalente entre dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de éste, y un antígeno. El término "afinidad de unión" se usa para describir interacciones monovalentes (actividad intrínseca).

La afinidad de unión entre dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo, o un fragmento del mismo, y un antígeno, a través de una interacción monovalente puede cuantificarse mediante la determinación de la constante de disociación, o unión, (K_D). A su vez, la K_D puede determinarse mediante la medición de la cinética de la formación y disociación de complejos, por ejemplo, mediante el método SPR (Biacore). Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente se denominan como la constante de la tasa de asociación k_a (o k_{on}) y constante de la tasa de disociación k_d (o k_{off}), respectivamente. K_D se relaciona con k_a y k_d a través de la ecuación $K_D = k_d / k_a$.

Después de la definición anterior, las afinidades de unión asociadas con diferentes interacciones moleculares, por ejemplo la comparación de la afinidad de unión de diferentes anticuerpos para un antígeno dado, pueden compararse mediante la comparación de los valores de K_D para los complejos individuales anticuerpo/antígeno.

De manera similar, la especificidad de una interacción puede evaluarse mediante la determinación y comparación del valor de K_D para la interacción de interés, por ejemplo, una interacción específica entre un anticuerpo y un antígeno, con el valor de K_D de una interacción no de interés.

Típicamente, la K_D para el anticuerpo con respecto a la diana será de 2 veces, preferentemente, 5 veces, con mayor preferencia, 10 veces menor que la K_D con respecto a la otra molécula no diana, tal como material no relacionado o material acompañante en el ambiente. Con mayor preferencia, la K_D será 50 veces menor, tal como 100 veces menor, o 200 veces menor; incluso con mayor preferencia 500 veces menor, tal como 1 000 veces menor o 10 000 veces menor.

El valor de esta constante de unión puede determinarse directamente mediante métodos bien conocidos, y puede calcularse incluso para mezclas complejas mediante métodos tales como aquellos, por ejemplo, expuestos en Caceci y otros (Byte 9:340-362, 1984). Por ejemplo, la K_D puede establecerse mediante el uso de un ensayo de unión a filtro de nitrocelulosa de doble filtro tal como el descrito por Wong y Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90, 5428-5432, 1993). Otros ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de ligandos tal como anticuerpos hacia las dianas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencias de Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión y la afinidad de unión del anticuerpo pueden evaluarse, además, mediante ensayos estándar

conocidos en la técnica, tales como Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), por ejemplo, mediante el uso de un sistema Biacore™.

Puede realizarse un ensayo de unión competitiva en el que la unión del anticuerpo a la diana se compara con la unión de la diana por otro ligando de esa diana, tal como otro anticuerpo. La concentración a la que se produce el 50 % de inhibición se conoce como la Ki. En condiciones ideales, la Ki es equivalente a K_D. El valor de Ki nunca será menor que la K_D, por lo que la medición de Ki se puede sustituir convenientemente para proporcionar un límite superior para K_D.

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede tener una K_D para su diana de 1 x 10^{-7}M o menos, 1 x 10^{-8}M o menos, o 1 x 10^{-9}M o menos, o 1 x 10^{-10}M o menos, 1 x 10^{-11}M o menos, o 1 x 10^{-12}M o menos. La K_D de un anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser menor que 0,8 nM, tal como menor que 0,7 nM, tal como menor que 0,6 nM, tal como menor que 0,5 nM, tal como menor que 0,4 nM, tal como menor que 0,3 nM, tal como menor que 0,2 nM, tal como menor que 0,1 nM, tal como menor que 0,05 nM, tal como menor que 0,025 nM, tal como menor que 0,015 nM, tal como menor que 0,10 nM.

Un anticuerpo que se une específicamente a su diana puede unirse a su diana con una alta afinidad, es decir, que exhibe una baja K_D como se discutió anteriormente, y puede unirse a otras moléculas no diana con una menor afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a moléculas no dianas con una K_D de 1 x 10^{-6} M o más, con mayor preferencia, 1 x 10^{-5} M o más, con mayor preferencia, 1 x 10^{-4} M o más, con mayor preferencia, 1 x 10^{-3} M o más, aún con mayor preferencia, 1 x 10^{-2} M o más. Un anticuerpo descrito en la presente descripción es, preferentemente, capaz de unirse a su diana con una afinidad que es al menos dos veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces o 10 000 veces o mayor que su afinidad por unirse a otra molécula no diana.

El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de neutralizar la inhibición de TFPI del complejo FVIIa/TF/FX.

El anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser capaz de unirse a TFPI de manera que el porcentaje de TFPI libre en un sujeto se reduzca a menos del 50 %, tal como menos del 30 %, tal como menos del 29 %, tal como menos del 28 %, tal como menos del 27 %, como menos del 26 %, como menos del 25 %, como menos del 24 %, como menos del 23 %, como menos del 22 %, como menos del 21 %, como menos del 20 %, como menos del 19 %, como menos del 18 %, como menos del 17 %, como menos del 16 %, como menos del 15 %, como menos del 14 %, como menos del 13 %, como menos del 12 %, como menos del 11 %, como menos del 10 %, como menos del 9 %, como menos del 8 %, como menos del 7 %, como menos del 6 %, como menos del 5 %, como menos del 4 %, como menos del 3 %, como menos del 2 %, como menos del 1 %, tal como entre 1 % y 0 %.

El término “región determinante de la complementariedad” (“CDR”) o “región hipervariable”, cuando se usa en la presente descripción, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. Las CDR se componen generalmente de residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat y otros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH Núm. 91-3242) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917). Típicamente, la numeración de los residuos de aminoácidos en esta región se realiza mediante el método descrito en Kabat y otros, más arriba. Las frases tales como “posición Kabat”, “residuo de Kabat”, y “de acuerdo con Kabat” en la presente descripción se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera. Mediante el uso del sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener pocos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, un marco (FR) o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir inserciones de aminoácidos (residuo 52a, 52b y 52c de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de CDR H2 y residuos insertados (*por ejemplo,* residuos 82a, 82b, y 82c, etcétera de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

Los términos “región marco” o residuos “FR” se refieren a los residuos de aminoácidos VH o VL que no están dentro de las CDR, como se define en la presente descripción.

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede comprender una región CDR de uno o más de los anticuerpos específicos descritos en la presente descripción, tal como una región CDR dentro de las SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13 o 15. Las secuencias de CDR dentro de la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción pueden identificarse en: los aminoácidos 24 a 34, 50 a 56 y 89 a 97 de la SEQ ID NO: 7; los aminoácidos 24 a 33, 49 a 55 y 88 a 96 de la SEQ ID NO: 11; los aminoácidos 24 a 38, 54 a 60 y 93 a 101 de la SEQ ID NO: 15. Las secuencias de CDR dentro de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente descripción pueden identificarse en: los aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 107 de la SEQ ID NO: 5 ; en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99-106 de la SEQ ID NO: 9; en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99-106 de la SEQ ID NO: 9; en los aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 y 99-111 de la SEQ ID NO: 13.

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede comprender una cualquiera o más de estas secuencias de CDR. Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede comprender la secuencia de cadena pesada CDR3 de uno de los anticuerpos descritos en la presente descripción, por ejemplo, los aminoácidos 99 a 107 de la SEQ ID NO: 5, 99 a 106 de la SEQ ID NO: 9 o 99 a 111 de la SEQ ID NO: 13. Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede comprender las seis CDR de uno de los anticuerpos específicos descritos en la presente descripción, tales como los aminoácidos CDR indicados anteriormente de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7, los aminoácidos CDR indicados anteriormente de la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 11 o los aminoácidos CDR indicados anteriormente de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 15.

El término “epítopo”, como se usa en la presente descripción, se define en el contexto de una interacción molecular entre un “polipéptido de unión a antígeno” (Ab) y su “antígeno” (Ag) correspondiente. El término antígeno (Ag) se refiere a la entidad molecular usada para la inmunización de un vertebrado inmunocompetente para producir el anticuerpo (Ab) que reconoce el Ag. En la presente, Ag se denomina de manera más amplia y generalmente está destinado a incluir moléculas diana que son específicamente reconocidas por el Ab, lo que incluye fragmentos o miméticos de la molécula usada en el proceso de inmunización para elevar el Ab. Por lo tanto, para los Ab que se unen al C-terminal de TFPI, tanto el TFPI de longitud completa como el TFPI truncado y otras variantes de TFPI que comprenden la porción C-terminal de TFPI se denominan como un Ag.

Generalmente, el término “epítopo” se refiere al área o región en un Ag a la que se une específicamente un Ab, es decir, el área o región en contacto físico con el Ab. Un epítopo proteico puede comprender residuos de aminoácidos en el Ag que se involucran directamente en la unión al Ab (también denominado el componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácidos, que no se involucran directamente en la unión, tales como los residuos de aminoácidos del Ag bloqueados eficazmente por el Ab (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la “superficie excluida al solvente” y/o la "huella" del Ab). El término epítopo en la presente descripción incluye ambos tipos de sitios de unión en cualquier región particular del dominio K3 o el dominio C-terminal de TFPI que se une específicamente a un anticuerpo anti-TFPI u otro agente específico al "C-terminal" de acuerdo con la invención, a menos que se indique lo contrario (*por ejemplo*, en algunos contextos, la invención se refiere a anticuerpos que se unen directamente a residuos de aminoácidos particulares). El "C-terminal" puede comprender un número de epítopos diferentes, que pueden incluir, sin limitación, (1) determinantes antigénicos peptídicos lineales, (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos ubicados cerca uno del otro en la conformación C-terminal madura; y (3) determinantes antigénicos postraduccionales que consisten, en su totalidad o en parte, en estructuras moleculares unidas covalentemente al "C-terminal", tal como los grupos de carbohidratos.

El epítopo para un par anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) dado puede definirse y caracterizarse a niveles diferentes de detalle mediante el uso de una variedad de métodos experimentales y computacionales de mapeo de epítopos. Los métodos experimentales incluyen mutagénesis, cristalografía de rayos X, espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), Espectrometría de Masa de Intercambio Hidrógeno-Deuterio (HX-MS) y diversos métodos de unión por competencia. Como cada método depende de un principio único la descripción de un epítopo se une íntimamente al método mediante el cual se ha determinado. Por lo tanto, el epítopo para un par Ab/Ag dado se definirá de manera diferente en dependencia del método de mapeo de epítopos empleado.

A su nivel más detallado, el epítopo para la interacción entre el Ag y el Ab puede definirse mediante las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción Ag-Ab, así como también la información acerca de sus contribuciones relativas a las termodinámicas de unión. A un nivel menos detallado, el epítopo puede caracterizarse mediante las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos entre el Ag y el Ab. A un nivel aún menos detallado, el epítopo puede caracterizarse mediante los residuos de aminoácidos que comprende como se define por un criterio específico, por ejemplo, la distancia entre átomos en el Ab y el Ag. A un nivel, aún menos detallado, el epítopo puede caracterizarse a través de la función, por ejemplo, mediante la unión por competencia con otros Ab. Además, el epítopo puede definirse más genéricamente como que comprende residuos de aminoácidos cuya sustitución por otro aminoácido alterará las características de la interacción entre el Ab y el Ag.

En el contexto de una estructura cristalina derivada por rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un Ab, por ejemplo, un fragmento Fab, y su Ag, el término epítopo en la presente descripción, a menos que se especifique de cualquier otra manera o se contradiga por el contexto, se define específicamente, como residuos de K3 o C-terminal caracterizado por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 2-6 Å, tal como 3 Å, tal como 4 Å, tal como 5 Å a partir de un átomo pesado en el Ab.

A partir del hecho de que las descripciones y definiciones de epítopos, en dependencia del método de mapeo de epítopos usado, se obtienen a niveles diferentes de detalle, se deduce que la comparación de epítopos para Ab diferentes en el mismo Ag puede conducirse de manera similar en niveles diferentes de detalle.

Se dice que los epítopos descritos en el nivel de residuo de aminoácido, por ejemplo, determinados a partir de una estructura por rayos X, son idénticos si contienen el mismo conjunto de residuos de aminoácidos. Se dice que los epítopos se superponen si los epítopos comparten al menos un residuo de aminoácido. Se dice que los epítopos son separados (únicos) si los epítopos no comparten ningún residuo de aminoácido.

Se dice que los epítopos caracterizados por unión de competencia se superponen si la unión de los Ab correspondientes son mutuamente excluyentes, es decir, si la unión de un Ab excluye la unión simultánea del otro Ab. Se dice que los epítopos son separados (únicos) si el Ag es capaz de acomodar la unión de ambos Ab correspondientes simultáneamente.

La definición del término “parátopo” se deriva de la definición anterior de “epítopo” al invertir la perspectiva. Por lo tanto, el término “parátopo” se refiere al área o región en el Ab al que se une específicamente un Ag, es decir, a la que hace contacto físico con el Ag.

En el contexto de una estructura cristalina derivada por rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un Ab, por ejemplo, un fragmento Fab, y su Ag, el término parátopo en la presente descripción, a menos que se especifique de cualquier otra manera o se contradiga por el contexto, se define específicamente, como residuos de Ag caracterizado por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 2-6 Å, tal como 3Å, tal como 4 Å, tal como 5 Å a partir de un átomo pesado en el dominio C-terminal.

El epítopo y el parátopo para un par dado de anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) pueden identificarse mediante métodos de rutina. Por ejemplo, la ubicación general de un epítopo puede determinarse mediante la evaluación de la capacidad de un anticuerpo para unirse a fragmentos o variantes diferentes de polipéptidos de TFPI. Los aminoácidos específicos dentro del TFPI que hacen contacto con un anticuerpo (epítopo) y los aminoácidos específicos en un anticuerpo que hacen contacto con el TFPI (parátopo) también pueden determinarse mediante el uso de métodos de rutina, tales como los descritos en los ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo y la molécula diana pueden combinarse y el complejo Ab/Ag puede cristalizarse. La estructura cristalina del complejo puede determinarse y usarse para identificar sitios específicos de interacción entre el anticuerpo y su diana.

Otros anticuerpos aún no identificados de acuerdo con la invención pueden identificarse al comparar su unión a TFPI con la del anticuerpo monoclonal MuTFPI4F110; o al comparar la función de los anticuerpos aún no identificados con la de MuTFPI4F110. Los análisis y ensayos que pueden usarse con el propósito de tal identificación incluyen ensayos neutralizantes de TFPI tales como: un ensayo de inhibición de FXa; un análisis de interacción ELISA y de unión, tal como los descritos en los ejemplos.

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede unirse a un epítopo que comprende uno o más residuos de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 residuos de aminoácidos, tales como 6-10 residuos de aminoácidos o 16-21 residuos de aminoácidos dentro del C-terminal del TFPI de longitud completa, en donde dicho uno o más aminoácidos tienen una accesibilidad relativa de más del 40 % cuando se mide como se describe en los Ejemplos. Por lo tanto, un anticuerpo descrito en la presente descripción puede unirse a un epítopo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 , 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 residuos de aminoácidos, tales como 6-10 residuos de aminoácidos o 16-21 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 186-187, 190, 192-208, 213, 215-220, 225-228, 230-234, 236-237 y 240-276 de la SEQ ID NO: 1.

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede unirse a un epítopo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 , 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 residuos de aminoácidos, tales como 6-10 residuos de aminoácidos o 16-21 residuos de aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en P186, S187, L190, P192, A193, D194, R195, G196, L197, C198, R199, A200, N201, E202, N203, R204, F205, Y206, Y207, N208, K213, R215, P216, F217, K218, Y219, S220, N225, E226, N227, N228, T230, S231, K232, Q233, E234, L236, R237, K240, K241, G242, F243, I244, Q245, R246, I247, S248, K249, G250, G251, L252, I253, K254, T255, K256, R257, K258, R259, K260, K261, Q262, R263, V264, K265, I266, A267, Y268, E269, E270, I271, F272, V273, K274, N275 y M276 de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a un epítopo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 residuos de aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en P186, S187, L190, P192, A193, D194, R195, G196, L197, C198, R199, A200, N201, E202, N203, R204, F205, Y206, Y207, N208, K213, R215, P216, F217, K218, Y219, S220, N225, E226, N227, N228, T230, S231, K232, Q233, E234, L236 y R237 de la SEQ ID NO: 1. El anticuerpo puede unirse a un epítopo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 residuos de aminoácidos, tales como 4-15 residuos de aminoácidos, tales como 6-10 residuos de aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en K240, K241, G242, F243, I244, Q245, R246, I247, S248, K249, G250, G251, L252, I253, K254, T255, K256, R257, K258, R259, K260, K261, Q262, R263, V264, K265, I266, A267, Y268, E269, E270, I271, F272, V273, K274, N275 y M276 de la SEQ ID NO: 1.

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede tener la capacidad de competir con otro anticuerpo descrito en la presente descripción para unirse a TFPI u otra diana apropiada, como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, un anticuerpo puede competir cruzadamente con los anticuerpos identificados como MuTFPI4F110, MuTFPI22F66 y MuTFPI22F71, descritos en la presente descripción, para unirse a TFPI, o a un fragmento o variante adecuado de TFPI que está unido por los anticuerpos MuTFPI4F110, MuTFPI22F66 y MuTFPI22F71. Tales anticuerpos que compiten cruzadamente pueden identificarse en función de su capacidad de competir cruzadamente

con un anticuerpo conocido en ensayos de unión estándar. Por ejemplo, SPR, por ejemplo, mediante el uso de un sistema Biacore™, ensayos ELISA o citometría de flujo pueden usarse para demostrar la competencia cruzada. Tal competencia cruzada puede sugerir que los dos anticuerpos se unen a epítopos idénticos, superpuestos o similares.

"Agrupación de epítopos" se refiere al uso de ensayos de unión competitiva para identificar pares de anticuerpos que son, o no, capaces de unirse a un antígeno, tal como TFPI, simultáneamente, identificando de esta manera anticuerpos que se unen al mismo, o a epítopos superpuestos de TFPI. Las familias de anticuerpos (o agrupaciones) que tienen la misma o superpuesta especificidad de unión, pueden usarse para ayudar a definir epítopos específicos en TFPI. Los experimentos de agrupación de epítopos proporcionan evidencia de que se presentan epítopos antigénicamente distintos. Sin embargo, por sí mismos, no identifican o "mapean" el epítopo a una secuencia de aminoácidos específica o ubicación en TFPI. La competencia por la unión se puede evaluar para cualquier par de anticuerpos o fragmentos. Las propiedades favorables de una familia (o agrupación) de anticuerpos pueden correlacionarse con la unión a un epítopo específico definido en términos de la agrupación de anticuerpos.

Como se explicó anteriormente, el TFPI regula negativamente la coagulación de la sangre. Lo hace inhibiendo la actividad de FXa e inhibiendo el complejo TF-FVIIa en presencia de FXa. La actividad de TFPI que es inhibida por un anticuerpo descrito en la presente descripción puede ser cualquiera de estas actividades o cualquier efecto aguas abajo del mismo. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente descripción puede conducir a un aumento en la coagulación de la sangre, un aumento en presencia o niveles de FXa o una actividad aumentada de TF-FVIIa. Preferentemente, un anticuerpo de la invención reduce el tiempo de coagulación cuando se pone en contacto con (a) plasma humano deficiente en FVIII o (b) sangre completa humana.

La medición de la actividad de TFPI puede comprender evaluar la actividad de TFPI libre para inhibir la coagulación o reducir el tiempo de coagulación en una muestra de sangre. Por ejemplo, tal un método puede comprender poner en contacto TFPI con una muestra de sangre, o un producto de la sangre tal como plasma o suero que comprende factores de coagulación de la sangre, en condiciones en las que debe ocurrir la coagulación, y determinar si la coagulación de la sangre se inhibe o se reduce el tiempo de coagulación por la presencia de TFPI. El nivel de coagulación de la sangre o el tiempo de coagulación en una muestra de este tipo se puede comparar con el de una muestra equivalente en la que también está presente un anticuerpo de prueba. Si el nivel de coagulación aumenta o el tiempo de coagulación se reduce en la muestra de anticuerpos, esto sugiere que el anticuerpo está inhibiendo la actividad de TFPI en la muestra.

La coagulación de la sangre se puede detectar buscando la coagulación de la sangre misma, del plasma o de una o más características de la cascada de coagulación que se encuentran aguas abajo del punto de acción de TFPI. Por ejemplo, el método puede evaluar los niveles de FXa o la activación de TF-FVIIa en la muestra.

Varios otros métodos para evaluar la coagulación de la sangre y el tiempo de coagulación se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, cualquier efecto de un anticuerpo sobre el tiempo de coagulación de la sangre puede evaluarse mediante el uso de un análisis de tiempo de protrombina diluida (análisis dPT) como se describe en los ejemplos. Brevemente, el plasma humano se pone en contacto con la tromboplastina humana. El tiempo que tarda el plasma en coagularse se mide en presencia y ausencia del anticuerpo de prueba. Se puede usar un control positivo en tal un análisis, tal como la adición de FVIIa (NovoSeven®), que se espera que reduzca el tiempo de coagulación. Un anticuerpo de la invención debería ser capaz de reducir el tiempo de coagulación en tal un método. Preferentemente, un anticuerpo de la invención es capaz de reducir el tiempo de coagulación de una manera dependiente de la dosis.

La tromboelastografía (TEG) puede usarse para evaluar la cinética de la formación de coágulos y la fibrinólisis en muestras de sangre completa, tal como en sangre total deficiente en FVIII. La capacidad de un anticuerpo para reducir el tiempo de coagulación o para estimular la coagulación de la sangre puede evaluarse de manera similar en una muestra de sangre completa al comparar el tiempo necesario para la formación de coágulos en presencia y ausencia del anticuerpo.

De este modo, se pueden llevar a cabo métodos para evaluar los efectos funcionales de un anticuerpo de la invención *in vitro*. Tales métodos se llevan a cabo preferentemente en muestras de sangre o plasma humano. Tales muestras pueden ser sangre o plasma humano normal o pueden ser deficientes en o suplementados con, uno o más factores implicados en la coagulación de la sangre. Por ejemplo, estos métodos pueden llevarse a cabo mediante el uso de sangre completa humana normal, plasma humano normal o plasma deficiente en FVIII o sangre completa. Se puede generar sangre o plasma deficientes en FVIII al poner en contacto una muestra de sangre o plasma adecuada con un anticuerpo neutralizante anti-FVIII. Tales métodos *in vitro* pueden ser análisis de interacción de unión o análisis de neutralización de TFPI, tal como los descritos en los ejemplos.

Una vez que se ha identificado y seleccionado un anticuerpo adecuado, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede identificarse mediante métodos conocidos en la técnica. Los genes que codifican el anticuerpo pueden clonarse mediante el uso cebadores específicos y/o degenerados. El anticuerpo puede producirse de manera recombinante por métodos de rutina.

También se describen polinucleótidos que codifican anticuerpos de la invención. Por lo tanto, un polinucleótido descrito en la presente descripción puede codificar cualquier anticuerpo como se describe en la presente descripción. Los términos “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de estos. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento génico, ARN mensajero (ARNm), ADNc, polinucleótidos recombinantes, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido descrito en la presente descripción puede proporcionarse en forma aislada o purificada.

Una secuencia de ácido nucleico que “codifica” un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Para los propósitos de la invención, dichas secuencias de ácido nucleico pueden incluir, pero no se limitan a, ADNc a partir de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias genómicas de ADN o ARN viral o procariota, e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción puede ubicarse en dirección 3' a la secuencia codificante.

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la presente descripción puede comprender una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos de VH o VL como se describe anteriormente. Por ejemplo, tal polinucleótido puede codificar un polipéptido que comprende una cualquiera o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13 y 15; o variantes o fragmentos de los mismas.

Los polinucleótidos pueden sintetizarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, como se describe a manera de ejemplo en Sambrook y otros (1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

Las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de un casete de expresión que incluye secuencias control, secuencias de péptido señal unidas operativamente a la secuencia insertada, lo que permite de esta forma la expresión del anticuerpo de la invención *in vivo*. Estos casetes de expresión, a su vez, se proporcionan típicamente dentro de vectores (por ejemplo, plásmidos o vectores virales recombinantes). Dicho casete de expresión puede administrarse directamente a un sujeto huésped. Alternativamente, un vector que comprende un polinucleótido puede administrarse a un sujeto huésped. Preferentemente, el polinucleótido se prepara y/o se administra mediante el uso de un vector genético. Un vector adecuado puede ser cualquier vector que sea capaz de portar una cantidad suficiente de información genética, y permitir la expresión de un polipéptido que codifica un anticuerpo descrito en la presente descripción.

La presente invención incluye, por lo tanto, vectores de expresión que comprenden dichas secuencias de polinucleótidos. Dichos vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de biología molecular y pueden implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, potenciadores, secuencias de péptido señal y otros elementos apropiados, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación que pueden ser necesarias, y que se ubican en la orientación correcta, para permitir la expresión de un péptido descrito en la presente descripción. Otros vectores adecuados serían evidentes para los expertos en la técnica. A manera de un ejemplo adicional con respecto a esto, nos referimos a Sambrook y otros.

También se proporcionan células que se han modificado para expresar un anticuerpo descrito en la presente descripción. Tales células incluyen líneas celulares eucariotas superiores, transitorias, o preferentemente estables, tales como células de mamíferos o células de insectos; células eucariotas inferiores, tales como levadura; o células procariotas tales como células bacterianas. Los ejemplos particulares de células que pueden modificarse mediante la inserción de vectores o casetes de expresión que codifican un anticuerpo descrito en la presente descripción incluyen células mamíferos HEK293, CHO, BHK, NSO y de retina humana. Preferentemente, la línea celular seleccionada será una que no sólo es estable, sino que permite además la glicosilación madura y la expresión en la superficie celular de un polipéptido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones y formulaciones que comprenden moléculas de la invención, tales como los anticuerpos, polinucleótidos, vectores y células descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos de la invención, formuladas junto con un portador aceptable farmacéuticamente.

En consecuencia, un objetivo de la invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende dicho anticuerpo que se presenta en una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, y en donde dicha formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender, además, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. El uso de conservantes, agentes isotónicos, agentes quelantes, estabilizantes y tensioactivos en las composiciones farmacéuticas se conoce bien por el experto. Puede hacerse referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na edición, 1995.

En una modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión. El término “formulación acuosa” se define como una formulación que comprende al menos 50 % p/p de agua. Igualmente, el término “solución acuosa” se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua, y el término “suspensión acuosa” se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.

En otro aspecto, la composición farmacéutica es una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes de su uso.

En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una solución acuosa de dicho anticuerpo, y un tampón, en donde el anticuerpo se presenta en una concentración de 1-200 mg/ml, y en donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

Se puede usar un anticuerpo o una formulación farmacéutica de la invención para tratar a un sujeto con una coagulopatía.

Como se usa en la presente descripción, el término “sujeto” incluye cualquier paciente humano, o vertebrado no humano, con una coagulopatía.

El término “tratamiento”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la terapia médica de cualquier sujeto humano u otro vertebrado que lo necesite. Se espera que dicho sujeto se haya sometido a un examen físico por parte de un médico, o un profesional médico veterinario, que ha dado un diagnóstico presuntivo o definitivo que indicaría que el uso de dicho tratamiento específico es beneficioso para la salud de dicho humano u otro vertebrado. El tiempo y el propósito de dicho tratamiento pueden variar de un individuo a otro, de acuerdo con el status quo de la salud del sujeto. Por lo tanto, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo. En términos de la presente invención, los tratamientos profilácticos, paliativos, sintomáticos y/o curativos pueden representar aspectos separados de la invención.

El término “coagulopatía”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una mayor tendencia hemorrágica que puede originarse por cualquier deficiencia cualitativa o cuantitativa de cualquier componente procoagulativo de la cascada de coagulación normal, o por cualquier regulación positiva de la fibrinólisis. Tales coagulopatías pueden ser congénitas y/o adquiridas y/o iatrogénicas y se identifican por un experto en la técnica.

Los ejemplos no limitantes de hipocoagulopatías congénitas son la hemofilia A, la hemofilia B, la deficiencia del Factor VII, la deficiencia del Factor XI, la enfermedad de von Willebrand y las trombocitopenias tales como la trombobastenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard-Soulier. La hemofilia A con "inhibidores" (es decir, los aloanticuerpos contra el factor VIII) y la hemofilia B con "inhibidores" (es decir, los aloanticuerpos contra el factor IX) son ejemplos no limitantes de coagulopatías que son parcialmente congénitas y parcialmente adquiridas.

Un ejemplo no limitante de una coagulopatía adquirida es la deficiencia de serina proteasa causada por la deficiencia de la vitamina K; tal deficiencia de la vitamina K puede provocarse por la administración de un antagonista de vitamina K, tal como la warfarina. La coagulopatía adquirida puede producirse, además, después de un trauma extenso. En este caso, conocido de cualquier otra manera como el “ciclo vicioso de sangramiento”, se caracteriza por hemodilución (trombocitopenia por dilución y dilución de factores de coagulación), hipotermia, consumo de factores de coagulación y trastornos metabólicos (acidosis). La terapia con fluidos y el aumento de la fibrinólisis pueden exacerbar esta situación. Dicha hemorragia puede ser de cualquier parte del cuerpo.

Un ejemplo no limitante de una coagulopatía iatrogénica es una sobredosificación de medicación anticoagulante - tal como heparina, aspirina, warfarina y otros inhibidores de la agregación plaquetaria - que pueden prescribirse para tratar la enfermedad tromboembólica. Un segundo ejemplo no limitante de coagulopatía iatrogénica es la que se induce por una terapia de fluido excesiva y/o inapropiada, tal como la que puede inducirse mediante una transfusión de sangre.

En una modalidad de la presente invención, la hemorragia se asocia con la hemofilia A o B. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con la hemofilia A o B con inhibidores adquiridos. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con trombocitopenia. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con la enfermedad de von Willebrand. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con graves daños tisulares. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con trauma grave. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con cirugía. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con gastritis y/o enteritis hemorrágica. En otra modalidad, la hemorragia es un sangrado uterino profuso, tal como en el desprendimiento de la placenta. En otra modalidad, la hemorragia se produce en órganos con una posibilidad limitada de hemostasia mecánica, tal como intracraneal, intraauricular o intraocularmente. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con terapia anticoagulante.

El uso de un anticuerpo o formulación de la invención puede reducir significativamente la pérdida de sangre en sujetos que lo necesitan. El uso de dicho anticuerpo o formulación puede reducir significativamente el tiempo de sangrado. Por lo tanto, la invención también es el uso de un anticuerpo que es capaz de unirse al C-terminal de TFPI, para el

tratamiento de un sujeto con una coagulopatía. Además, la invención es un método para tratar a un sujeto que lo necesita con un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse al C-terminal de TFPI. El uso de dicho anticuerpo monoclonal de la invención, preferentemente, reducirá *in vivo* el tiempo de coagulación sin causar trombocitopenia transitoria.

Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede administrarse por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, tal como por vía intramuscular, tal como por vía subcutánea. Alternativamente, un anticuerpo descrito en la presente descripción puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como a través de la boca o tópicamente. Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede administrarse profilácticamente. Un anticuerpo descrito en la presente descripción puede administrarse terapéuticamente (a demanda).

Una dosificación adecuada de un anticuerpo descrito en la presente descripción puede determinarse por un profesional médico o veterinario experto. Una dosis adecuada de un anticuerpo puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente a tratar.

Además, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden coadministrarse con uno o más otros agentes terapéuticos o formulaciones. El otro agente puede ser un agente que potencia la hemostasia, tal como un polipéptido del Factor VIIa, un polipéptido del Factor VIII o un polipéptido del Factor IX. El otro agente puede estar destinado a tratar otros síntomas o afecciones del paciente. Por ejemplo, el otro agente puede ser un analgésico, un inmunosupresor o un agente antiinflamatorio. El otro agente puede ser un anticuerpo monoclonal, tal como uno de los descritos en la solicitud de patente internacional WO2010072691.

La coadministración de un anticuerpo descrito en la presente descripción y dicho uno o más otros agentes se puede lograr de varias maneras diferentes. En una modalidad, un anticuerpo descrito en la presente descripción y el otro agente pueden administrarse juntos en una única composición. En otra modalidad, un anticuerpo descrito en la presente descripción y el otro agente pueden administrarse por separado pero como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente descripción puede administrarse antes, después o simultáneamente con el otro agente. En su sentido más amplio, la coadministración de acuerdo con la presente invención se refiere a un anticuerpo descrito en la presente descripción y al otro agente presente en la sangre humana al mismo tiempo, independientemente del momento en que se administraron los dos o más agentes. Por lo tanto, un anticuerpo descrito en la presente descripción puede estar presente en la sangre al mismo tiempo que un polipéptido del FVIIa, un polipéptido del FVIII o un polipéptido de FIX exógenos.

El término “Factor VII(a)”, en la presente descripción, abarca el zimógeno no hendido, el Factor VII (FVII), así como también la proteasa hendida y por lo tanto activada, el Factor VIIa (FVIIa). El “Factor VII(a)” incluye variantes alélicas naturales del FVII(a) que pueden existir y producirse de un individuo a otro. Una secuencia del Factor VIIa humano de tipo salvaje se proporciona en la SEQ ID NO: 19, así como también en Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1986;83:2412-2416.

Factor VII(a) de coagulación humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 19):

ANAFLγγLRPGSLγRγCKγγQCSFγγARγIFKDAγRTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCK-
DQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHE-
GYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKR-
NASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFD-
KIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLT-
DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGA-
TALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR-
GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP

El FVII de tipo salvaje consiste en 406 residuos de aminoácidos y se compone de cuatro dominios según se definió por homología. Existe un dominio Gla N-terminal seguido de dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un dominio de serina proteasa C-terminal. El FVII circula en plasma como una molécula de cadena simple. Tras activarse hacia FVII activado (FVIIa), la molécula es hendida entre los residuos Arg152 e Ile153, lo que resulta en una proteína bicatenaria mantenida unida por un enlace disulfuro. La cadena ligera contiene los dominios Gla y similares a EGF, mientras que la cadena pesada es el dominio de proteasa. El FVIIa requiere la unión a su factor tisular (TF) cofactor de superficie celular para volverse activo biológicamente.

El Factor VII(a) puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento. En la SEQ ID NO. 19, "γ” (gamma) representa representa restos gamma-carboxilados de Glu ('E'). El término “polipéptido del Factor VII(a)”, en la presente descripción, se refiere a moléculas del Factor VIIa de tipo salvaje, así como también a variantes del FVII(a), derivados del FVII(a) y conjugados del FVII(a). Tales variantes, derivados y conjugados pueden exhibir sustancialmente la misma actividad biológica, o mejorada, con relación al Factor VIIa humano de tipo salvaje.

El término “variante del FVII(a)”, como se usa en la presente descripción, pretende designar el Factor FVII que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 19, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han eliminado y/o en donde uno o más aminoácidos se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental. Dicha adición puede tener lugar ya sea en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína parental o en ambos. El “análogo” o “análogos” dentro de esta definición todavía tiene actividad FVII en su forma activada. En una modalidad, una variante es al menos 90 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 19. En otra modalidad, una variante es al menos 95 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 19. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a una posición específica se refiere a la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 19.

Los ejemplos no limitantes de variantes del FVII(a) que tienen sustancialmente la misma o mayor actividad proteolítica en comparación con el Factor VII(a) humano de tipo salvaje recombinante incluyen los descritos en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/027147, WO 03/037932, WO 04/029090, WO 05/024006, y EP 05108713.8, US 7173000 B2; y JP4451514 B2.

El término "derivado del Factor VII(a)", como se usa en la presente descripción, pretende designar un polipéptido del FVII que exhibe sustancialmente la misma o mejorada actividad biológica en relación al Factor VIIa de tipo salvaje, en el que uno o más de los aminoácidos del péptido parental ha sido modificado genéticamente y/o químicamente y/o enzimáticamente, tal como mediante alquilación, glicosilación, PEGilación, acilación, formación de éster, formación de enlaces disulfuro o formación de amidas.

El término "Factor VII(a) humano PEGilado" se refiere a un polipéptido del Factor VII(a) humano, al que se ha conjugado una molécula de PEG. Tal una molécula de PEG puede estar unida a cualquier parte del polipéptido del Factor VIIa, incluido cualquier residuo de aminoácido o resto de carbohidrato del polipéptido del Factor VIIa. Esto incluye pero no se limita al Factor VIIa humano PEGilado, Factor VIIa humano PEGilado con cisteína y sus variantes. Los ejemplos no limitantes de derivados del Factor VII incluyen derivados de FVII(a) glucoPEGilados como se describe en los documentos WO 03/031464 y WO 04/099231 y WO 02/077218,

El término "Factor VII(a) humano PEGilado con cisteína" se refiere a un polipéptido del Factor VII(a) en el que una molécula de PEG se conjuga con un grupo sulfhidrilo de una cisteína que se ha introducido en dicho Factor VIIa humano.

El término “actividad biológica mejorada” se refiere a polipéptidos del FVII(a) que muestran i) sustancialmente la misma o mayor actividad proteolítica en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante en presencia y/o ausencia del factor tisular o ii) a polipéptidos del FVII(a) con sustancialmente la misma o mayor afinidad por TF en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante o iii) a polipéptidos del FVII(a) con sustancialmente la misma o mayor vida media en plasma en comparación con el Factor VIIa humano de tipo salvaje recombinante, o iv) a polipéptidos del FVII(a) con sustancialmente la misma o mayor afinidad por la plaqueta activada. La actividad de los polipéptidos de FVIIa se puede probar mediante el uso de, por ejemplo, el ensayo de hidrólisis *in vitro* o el ensayo de proteólisis *in vitro*, como se describe en los ejemplos.

El “Factor VIII” o “FVIII”, en la presente descripción, se refiere a una glicoproteína plasmática humana que es un miembro de la vía de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación de la sangre. El “FVIII natural” es la molécula FVIII humana derivada de la secuencia de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO: 20 (aminoácidos 1-2332). Los términos “Factor VIII(a)” y “FVIII(a)” en la presente descripción incluyen tanto FVIII como FVIIIa. El “FVIII(a)” incluye variantes alélicas naturales del FVIII(a) que pueden existir y producirse de un individuo a otro. El FVIII(a) puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante, mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, sulfatación de tirosinas y otras modificaciones postraducción puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.

El Factor VIII (FVIII) es una glicoproteína grande y compleja que se produce principalmente por los hepatocitos. El FVIII consiste en 2351 aminoácidos, lo que incluye un péptido de señalización, y contiene varios dominios distintos según se define por homología. Existen tres dominios A, un dominio B único y dos dominios C. El orden de dominio puede enumerarse como NH2-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. El FVIII circula en el plasma como dos cadenas, separado en el borde B-A3. Las cadenas se conectan mediante enlaces iónicos de metal bivalente. La cadena A1-A2-B se denomina la cadena pesada (HC) mientras que la A3-C1-C2 se denomina cadena ligera (LC). Las regiones ácidas pequeñas C-terminal del A1 (la región a1) y A2 (la región a2) y N-terminal del dominio A3 (la región a3) juegan papeles importantes en su interacción con otras proteínas de coagulación, lo que incluye la trombina y el factor de von Willebrand (vWF o VWF), la proteína portadora para el FVIII.

Las moléculas de FVIII endógeno circulan *in vivo* como un agrupamiento de moléculas con dominios B de varios tamaños, el más corto tiene el C-terminal en la posición 740, es decir, en el C-terminal de A2-a_2. Estas moléculas de FVIII con dominios B de longitud diferente tienen todas actividad procoagulante total. Tras la activación con la trombina, el FVIII es hendido en el C-terminal de A1-a_1 en la posición 372, el C-terminal de A2-a_2 en la posición 740, y entre a_3 y A3 en la posición 1689, la última escisión que libera la región a_3, con pérdida concomitante de afinidad por VWF. La

molécula del FVIII activado se denomina FVIIIa. La activación permite la interacción de FVIIIa con superficies fosfolipídicas como plaquetas activadas y el factor IX activado (FIXa), es decir, se forma el complejo tenasa, lo que permite la activación eficiente del factor X (FX).

Las moléculas/variantes del FVIII pueden ser moléculas de FVIII truncadas en el dominio B, en donde los dominios restantes corresponden estrechamente a las secuencias como se expone en los números de aminoácidos 1-740 y 1649-2332 de la SEQ ID NO: 20. En dichas variantes, así como también en el FVIII derivado de la secuencia de longitud completa, las mutaciones pueden introducirse para, por ejemplo, reducir la capacidad de unión a vWF. Las modificaciones de aminoácidos, tales como sustituciones y deleciones, pueden introducirse en la molécula para modificar la capacidad de unión del FVIII con diversos otros componentes tales como LRP, diversos receptores, otros factores de coagulación, superficies celulares, introducción y/o supresión de sitios de glicosilación, etc. Otras mutaciones que no suprimen la actividad del FVIII también pueden acomodarse en una molécula/variante del FVIII de acuerdo con la presente invención.

Las moléculas de FVIII que se administran de acuerdo con la presente invención son capaces de funcionar en la cascada de coagulación de una manera que es funcionalmente similar, o equivalente, al FVIII, lo que induce la formación de FXa mediante la interacción con FIXa en una plaqueta activada y respalda la formación de un coágulo de sangre. La actividad del FVIII puede evaluarse *in vitro* mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica. Los análisis de coágulos, los ensayos de activación de FX (frecuentemente denominados ensayos cromogénicos), los ensayos de generación de trombina y la tromboelastografía de sangre total son ejemplos de tales técnicas *in vitro*. Las moléculas de FVIII de acuerdo con la presente invención tienen una actividad de FVIII que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, 100 % o incluso más del 100 % de la del FVIII humano nativo.

El dominio B en FVIII abarca los aminoácidos 741-1648 de la SEQ ID NO: 20. El dominio B es hendido en varios sitios diferentes, lo que genera gran heterogeneidad en las moléculas de FVIII en plasma circulante. Se desconoce la función exacta del dominio B fuertemente glicosilado. Lo que se conoce es que el dominio B es dispensable para la actividad del FVIII en la cascada de coagulación. De esta forma, el FVIII recombinante se produce frecuentemente en forma de variantes eliminadas/truncadas del dominio B.

El FVIII endógeno de longitud completa se sintetiza como una molécula precursora de cadena simple. Antes de la secreción, el precursor es hendido en la cadena pesada y la cadena ligera. El FVIII recombinante con dominio B eliminado puede producirse por medio de dos estrategias diferentes. Ya sea la cadena pesada sin el dominio B y la cadena ligera se sintetizan individualmente como dos cadenas polipeptídicas diferentes (estrategia de dos cadenas) o el FVIII con dominio B eliminado se sintetiza como una cadena polipeptídica precursora única (estrategia de cadena simple) que es hendido en las cadenas pesada y ligera de la misma manera que el precursor de FVIII de longitud completa.

En un polipéptido precursor de FVIII con dominio B eliminado, producido por la estrategia de cadena simple, los restos de cadena pesada y ligera se separan frecuentemente por un enlazador. Para minimizar el riesgo de introducir epítopos inmunogénicos en el FVIII con dominio B eliminado, la secuencia del enlazador se deriva, preferentemente, del dominio B del FVIII. Como mínimo, el enlazador debe comprender un sitio de reconocimiento para la proteasa que escinde el polipéptido precursor de FVIII con dominio B eliminado en las cadenas pesada y ligera. En el dominio B del FVIII de longitud completa, los aminoácidos 1644-1648 constituyen este sitio de reconocimiento. El sitio de escisión de trombina que conduce a la eliminación del enlazador en la activación del FVIII con dominio B eliminado se ubica en la cadena pesada. Por lo tanto, es poco probable que el tamaño y la secuencia de aminoácidos del enlazador influyan en su eliminación de la molécula FVIII restante por la activación de la trombina. La deleción/truncamiento del dominio B es una ventaja para la producción del FVIII. No obstante, las partes del dominio B pueden incluirse en el enlazador sin reducir la productividad. El efecto negativo del dominio B sobre la productividad no se ha atribuido a ningún tamaño o secuencia específica del dominio B.

El Factor IXa (FIXa) es una serina proteasa similar a tripsina que cumple un papel clave en la hemostasia mediante la generación, como parte del complejo de tenasa, de la mayoría del Factor Xa requerido para respaldar una formación de trombina adecuada durante la coagulación (revisado en (Hoffman y Monroe, III 2001)).
El Factor IX (FIX) es un factor de coagulación dependiente de vitamina K con similitudes estructurales al Factor VII, protrombina, Factor X, y proteína C. La forma de zimógeno circulante consiste en 415 aminoácidos divididos en cuatro dominios distintos que comprenden un dominio N-terminal rico en ácido γ-carboxiglutámico (Gla), dos dominios EGF y un dominio C-terminal serina proteasa similar a tripsina. La activación del FIX se produce por proteólisis limitada en Arg^{145}-Ala^{146} y Arg^{180}-Val^{181} lo que libera un fragmento de 35 aa, el denominado péptido de activación (Schmidt y Bajaj 2003). El péptido de activación es fuertemente glicosilado, y contiene dos glicanos ligados a N y hasta cuatro glicanos ligados a O.

El “Factor IX” o “FIX”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una glicoproteína del Factor IX plasmático humano que es un miembro de la vía de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación de la sangre. El

“Factor IX(a)” incluye variantes alélicas naturales de FIX(a) que pueden existir y producirse de un individuo a otro. El Factor IX(a) puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento. A menos que se especifique o se indique de cualquier otra manera, Factor IX significa cualquier molécula de proteína Factor IX humano funcional en su papel normal en la coagulación, lo que incluye cualquier fragmento, análogo y derivado de esta.

Un ejemplo de un “FIX de tipo salvaje” es la molécula FIX humana de longitud completa, como se muestra en la SEQ ID NO: 21.

Factor IX de coagulación humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 21):

YNSGKLγγFVQGNLγRγCMγγKCSFγγARγVFγNTγRT-
TγFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYE-
CWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCPAV-
PFPCGRVSVSQTSKLTRAEAVFPDVDYV-
NSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGG-
SIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDI-
ALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYL-
RVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLT-
GIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT

En SEQ ID NO: 21, "γ" representa restos de Glu ('E') gamma-carboxilados. En el FIX completamente gamma-carboxilado, los primeros 12 residuos de Glu están gamma-carboxilados, pero hay variantes, especialmente en el caso del FIX recombinante, en las que tiene lugar menos gamma-carboxilación. Tome en cuenta, también, que se produce un dimorfismo en FIX en la posición 148, que puede ser tanto Ala como Thr (véase McGraw y otros (1985) PNAS, 82:2847). Ambos son FIX de "tipo salvaje".

Se pretende que los términos “análogos de FIX”, como se usa en la presente descripción, designen el Factor FIX que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 21, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han eliminado y/o en donde uno o más aminoácidos se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental. Dicha adición puede tener lugar ya sea en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína parental o en ambos. El “análogo” o “análogos” dentro de esta definición todavía tiene actividad FIX en su forma activada. En una modalidad, una variante es al menos 90 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 21. En una modalidad adicional, una variante es al menos 95 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 21. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a una posición específica se refiere a la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 21.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, los dominios del factor IX incluyen los residuos de aminoácidos siguientes: El dominio Gla es la región desde el residuo Tyr1 hasta el residuo Lys43; el EGF1 es la región desde el residuo Gln44 hasta el residuo Leu84; el EGF2 es la región desde el residuo Asp85 hasta el residuo Arg145; el péptido de activación es la región desde el residuo Ala146 hasta el residuo Arg180; y el dominio de proteasa es la región desde el residuo Val181 hasta el residuo Thr414. La cadena ligera se refiere a la región que abarca el dominio Gla, EGF1 y EGF2, mientras que la cadena pesada se refiere al dominio de proteasa.

La actividad de coagulación de los agentes procoagulantes tales como el polipéptido del FVIIa, un polipéptido del FVIII o un polipéptido de Factor IX puede determinarse mediante el uso de ensayos de coagulación que se conocen por la persona experta en la técnica, tales como los descritos en los Ejemplos.

El médico especialista en medicina o veterinaria puede determinar el momento en que los anticuerpos descritos en la presente descripción deben coadministrarse con un segundo agente, tal como un polipéptido de Factor VIIa, un polipéptido de Factor VIII o un polipéptido de Factor IX.

Esta descripción incluye, además, las modalidades enumerados más abajo, estas no se interpretarán como una descripción de la invención reivindicada.

Modalidad 1: Un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente al C-terminal de TFPI de longitud completa.

Modalidad 1a: El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 1, en donde dicho C-terminal son los aminoácidos 186-276 de TFPI humano (SEQ ID NO: 1).

Modalidad 1b: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 o 1a, que es un anticuerpo monoclonal.

Modalidad 2: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-1b, en donde el epítopo de dicho anticuerpo comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en P186, S187, L190, P192, A193, D194, R195, G196, L197, C198, R199, A200, N201, E202, N203, R204, F205, Y206, Y207, N208, K213, R215, P216, F217, K218, Y219, S220, N225, E226, N227, N228, T230, S231, K232, Q233, E234, L236, R237, K240, K241, G242, F243, I244, Q245, R246, I247, S248, K249, G250, G251, L252, I253, K254, T255, K256, R257, K258, R259, K260, K261, Q262, R263, V264, K265, I266, A267, Y268, E269, E270, I271, F272, V273, K274, N275 y M276 de la SEQ ID NO: 1.

Modalidad 2a: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-1b, en donde el epítopo de dicho anticuerpo comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en P186, S187, L190, P192, A193, D194, R195, G196, L197, C198, R199, A200, N201, E202, N203, R204, F205, Y206, Y207, N208, K213, R215, P216, F217, K218, Y219, S220, N225, E226, N227, N228, T230, S231, K232, Q233, E234, L236, R237, K240, K241, G242 y F243 de la SEQ ID NO: 1.

Modalidad 3: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-1b, en donde el epítopo de dicho anticuerpo comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en P186, S187, L190, P192, A193, D194, R195, G196, L197, C198, R199, A200, N201, E202, N203, R204, F205, Y206, Y207, N208, K213, R215, P216, F217, K218, Y219, S220, N225, E226, N227, N228, T230, S231, K232, Q233, E234, L236 y R237 de la SEQ ID NO: 1.

Modalidad 4: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-1b, en donde el epítopo de dicho anticuerpo comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en K240, K241, G242, F243, I244, Q245, R246, I247, S248, K249, G250, G251, L252, I253, K254, T255, K256, R257, K258, R259, K260, K261, Q262, R263, V264, K265, I266, A267, Y268, E269, E270, I271, F272, V273, K274, N275 y M276 de la SEQ ID NO: 1.

Modalidad 5: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (SYYMY) de la SEQ ID NO: 5, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 6: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-5, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (EINPSNGDTNLNEKFKS) de la SEQ ID NO: 5, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 7: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-6, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-107 (WDRFDGFVY) de la SEQ ID NO: 5, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 8: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (GYPMN) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 9: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 8, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (LINPYNGDTTFNQKFKG) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 10: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 8-9, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-106 (GTYEYVDY) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 11: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (TYWIH) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 12: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 11, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (AIDPGNSDATYSQKFKD) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.
Modalidad 13: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 11-12, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-111 (EVYYGYDGDYFDY) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 14: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-7, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-34 (IISTNIDDDIN) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 15: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-7 y 14, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-56 (EGNTLRP) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 16: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-7 y 14-15, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de los aminoácidos 89-97 (LQSDDLPYT) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno o dos de estos aminoácidos puede sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 17: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 8-10, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-33 (SASSSVFYMH) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 18: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, 8-10 y 17, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de los aminoácidos 49-55 (DTSILSS) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 19: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, 8-10 y 17-18, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de los aminoácidos 88-96 (QQWSSYPLT) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 20: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 11-13, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de aminoácidos 24-38 (RASESVSVHGTHLMH) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 21: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, 11-13 y 20, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR2 de los aminoácidos 54-60 (AASKLES) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 22: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, 11-13 y 20-21, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR3 de los aminoácidos 93-101 (QQSIGDPWT) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 23: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (SYYMY) de la SEQ ID NO: 5, en donde uno de estos residuos de aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (EINPSNGDTNLNEKFKS) de la SEQ ID NO: 5, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-107 (WDRFDGFVY) de la SEQ ID NO:5, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 24: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (GYPMN) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (LINPYNGDTTFNQKFKG) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-106 (GTYEYVDY) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 25: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (TYWIH) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (AIDPGNSDATYSQKFKD) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-111 (EVYYGYDGDYFDY) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 26: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-34 (IISTNIDDDIN) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-56 (EGNTLRP) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 89-97 (LQSDDLPYT) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 27: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-33 (SASSSVFYMH) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 49-55 (DTSILSS) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 88-96 (QQWSSYPLT) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 28: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-38 (RASESVSVHGTHLMH) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 54-60 (AASKLES) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 93-101 (QQSIGDPWT) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 29: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (SYYMY) de la SEQ ID NO: 5, en donde uno de estos residuos de aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (EINPSNGDTNLNEKFKS) de la SEQ ID NO: 5, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-107 (WDRFDGFVY) de la SEQ ID NO:5, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

y en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-34 (IISTNIDDDIN) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-56 (EGNTLRP) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 89-97 (LQSDDLPYT) de la SEQ ID NO: 7, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 30: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (GYPMN) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (LINPYNGDTTFNQKFKG) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-106 (GTYEYVDY) de la SEQ ID NO: 9, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

y en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-33 (SASSSVFYMH) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 49-55 (DTSILSS) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 88-96 (QQWSSYPLT) de la SEQ ID NO: 11, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 31: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (TYWIH) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (AIDPGNSDATYSQKFKD) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-111 (EVYYGYDGDYFDY) de la SEQ ID NO: 13, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

y en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-38 (RASESVSVHGTHLMH) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 54-60 (AASKLES) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 93-101 (QQSIGDPWT) de la SEQ ID NO: 15, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 32: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 5-31, en donde dicha sustitución de aminoácidos es una sustitución conservadora.

Modalidad 33: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (SYYMY) de la SEQ ID NO: 5 y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (EINPSNGDTNLNEKFKS) de la SEQ ID NO: 5 y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-107 (WDRFDGFVY) de la SEQ ID NO: 5;

y en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-34 (IISTNIDDDIN) de la SEQ ID NO: 7 y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-56 (EGNTLRP) de la SEQ ID NO: 7 y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 89-97 (LQSDDLPYT) de la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 34: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (GYPMN) de la SEQ ID NO: 9,
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (LINPYNGDTTFNQKFKG) de la SEQ ID NO: 9 y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-106 (GTYEYVDY) de la SEQ ID NO: 9;

y en donde la cadena ligera comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-33 (SASSSVFYMH) de la SEQ ID NO: 11,
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 49-55 (DTSILSS) de la SEQ ID NO: 11 y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 88-96 (QQWSSYPLT) de la SEQ ID NO: 11.

Modalidad 35: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31-35 (TYWIH) de la SEQ ID NO: 13,
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (AIDPGNSDATYSQKFKD) de la SEQ ID NO: 13 y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-111 (EVYYGYDGDYFDY) de la SEQ ID NO: 13;

y en donde la cadena ligera comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-38 (RASESVSVHGTHLMH) de la SEQ ID NO: 15,
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 54-60 (AASKLES) de la SEQ ID NO: 15 y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 93-101 (QQSIGDPWT) de la SEQ ID NO: 15.

Modalidad 36: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 5.

Modalidad 37: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 36, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 38: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 9.

Modalidad 39: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 38, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 11.

Modalidad 40: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 41: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4 y 40, en donde la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 15.

Modalidad 42: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 43: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 11.

Modalidad 44: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-4, en donde dicho anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 15.

Modalidad 45: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-44, que es un anticuerpo humanizado.

Modalidad 46: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-45, en donde el isotipo de dicho anticuerpo es IgG.

Modalidad 47: El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 46, en donde dicho isotipo es IgG1, IgG2 o IgG4.

Modalidad 48: El anticuerpo de acuerdo con la modalidad 47, en donde el isotipo de dicho anticuerpo es IgG4.

Modalidad 49: El anticuerpo, de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-48, en donde la K_D de dicho anticuerpo es menor que 4,0 nM, tal como menor que 3,0 nM, tal como menor que 2,0 nM, tal como menor que 1,0 nM, tal como menor que 0,8 nM, tal como menor que 0,7 nM, tal como menor que 0,6 nM, tal como menor que 0,5 nM, tal como menor que 0,4 nM, tal como menor que 0,3 nM, tal como menor que 0,2 nM, tal como menor que 0,1 nM, tal como menor que 0,05 nM, tal como menor que 0,02 nM, tal como menor que 0,01 nM.

Modalidad 50: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-49, que no es capaz de unirse al TFPI truncado (1-185).

Modalidad 51: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-49, que no es capaz de unirse al TFPI truncado (1-239).

Modalidad 52: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-51, que no es capaz de unirse al dominio K1 o K2 de TFPI.

Modalidad 53: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-52, que no es capaz de unirse a TFPI anclado a GPI y/o TFPI unido a lipoproteína.

Modalidad 54: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-53, que es capaz de neutralizar la inhibición de TFPI de TF/FVIIa/FXa en presencia de fosfolípidos.

Modalidad 55: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-54, que es capaz de unirse al C-terminal de TFPI de manera que el porcentaje de TFPI libre en un sujeto se reduce a menos del 50 %, tal como menos del 40 %, tal como menos del 30 %, tal como menos del 20 %, tal como menos del 10 %.

Modalidad 55a: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-55, que es capaz de competir con MuTFPI4F110 para unirse a TFPI.

Modalidad 55b: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-55, que no es capaz de competir con MuTFPI4F110 para unirse a TFPI.

Modalidad 56: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-55a, que reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin reducir significativamente el recuento de plaquetas.

Modalidad 57: El anticuerpo, de acuerdo con la modalidad 56, en donde dicho recuento de plaquetas no se reduce a aproximadamente 80 %, tal como aproximadamente 75 %, tal como aproximadamente 70 %, tal como aproximadamente 65 %, tal como aproximadamente 60 %, tal como aproximadamente 55 %, tal como aproximadamente 50 %, tal como aproximadamente 45 %, tal como aproximadamente 40 %, tal como aproximadamente 35 %, tal como aproximadamente 30 %, tal como aproximadamente 25 % del recuento de plaquetas original.

Modalidad 58: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-57, que reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin causar trombocitopenia transitoria.

Modalidad 59: Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58.

Modalidad 59a: Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido de Factor VIIa, Factor VIII o Factor IX.

Modalidad 60: La formulación farmacéutica de acuerdo con la modalidad 59, que es adecuada para uso parenteral.

Modalidad 61: La formulación farmacéutica de acuerdo con la modalidad 60, que es adecuada para uso intravenoso.

Modalidad 62: La formulación farmacéutica de acuerdo con la modalidad 60, que es adecuada para uso subcutáneo.

Modalidad 63: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1–58, o la formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 58-62, para el tratamiento de un sujeto con una coagulopatía.

Modalidad 64: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58, o la formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 58-62, para el tratamiento de cualquier coagulopatía congénita, adquirida y/o iatrogénica, tal como puede seleccionarse del grupo que consiste en hemofilia A, con o sin inhibidores,

y hemofilia B, con o sin inhibidores.

Modalidad 64a: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y el segundo agente de coagulación, seleccionado de la lista que consiste en un polipéptido del FVIIa, un polipéptido del FVIII o un polipéptido del FIX, para el tratamiento de un sujeto con una coagulopatía.

Modalidad 64b: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FVIII para el tratamiento de la hemofilia A.

Modalidad 64c: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FIX para el tratamiento de la hemofilia B.

Modalidad 64d: El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FVIIa para el tratamiento de la hemofilia A o B con inhibidores.

Modalidad 65: Un método para tratar a un sujeto con una coagulopatía, que comprende administrar a dicho sujeto el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58.

Modalidad 65a: Un método para tratar a un sujeto con hemofilia A que comprende administrar a dicho sujeto el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FVIII.

Modalidad 65b: Un método para tratar a un sujeto con hemofilia B que comprende administrar a dicho sujeto el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FIX.

Modalidad 65c: Un método para tratar a un sujeto con deficiencia de FVII que comprende administrar a dicho sujeto el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FVII.

Modalidad 65d: Un método para tratar a un sujeto con hemofilia A con inhibidores, que comprende administrar a dicho sujeto el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FVII.

Modalidad 65e: Un método para tratar a un sujeto con hemofilia B con inhibidores, que comprende administrar a dicho sujeto el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58 y un polipéptido del FVII.

Modalidad 66: El método de acuerdo con la modalidad 61, en donde dicha coagulopatía es cualquier coagulopatía congénita, adquirida y/o iatrogénica, tal como puede seleccionarse del grupo que consiste en hemofilia A, con o sin inhibidores, y hemofilia B, con o sin inhibidores.

Modalidad 67: Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58.

Modalidad 68: Un polinucleótido de acuerdo con la modalidad 67, que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 y 14.

Modalidad 69: Una célula eucariota que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 67-69.

Modalidad 70: Una célula eucariota que expresa el anticuerpo, o el fragmento del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-58.

Modalidad 71: La célula eucariota de acuerdo con la modalidad 70, que es una célula de mamífero.

Modalidad 72: La célula de mamífero de acuerdo con la modalidad 71, que se selecciona del grupo que consiste en células HEK293, CHO, BHK, NSO y de retina humana.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no deben interpretarse como limitantes adicionales. El contenido de todas las figuras citadas a lo largo de esta solicitud se incorpora expresamente en la presente descripción como referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Inmunización y fusión

Los ratones se inmunizaron con TFPI de longitud completa (SEQ ID NO: 1).
Se usaron ratones RBF para las inmunizaciones y la producción de anticuerpos monoclonales de ratón. Las inyecciones se realizaron por vía subcutánea: en la espalda de los ratones. 20μg de TFPI se mezcló con adyuvante completo de Freund para la primera inyección. En las inmunizaciones posteriores, se usó adyuvante incompleto de Freund con la misma concentración de antígeno. Diez días después de la última inmunización, se cribó la sangre

ocular de los ratones, mediante el uso de ELISA, para anticuerpos específicos de TFPI. Los ratones con títulos positivos de suero recibieron una dosis de refuerzo de 10 g de TFPI mediante inyección intravenosa, y se sacrificaron después de tres días. Los bazos se eliminaron asépticamente y se dispersaron en una sola suspensión celular. La fusión de las células del bazo y las células de mieloma se realizó mediante el método PEG o mediante electrofusión.

Procedimiento de cribado

- Cribado para la unión a TFPI de longitud completa y sin unión a TFPI (1-161)
- Ensayos celulares con líneas celulares endoteliales o células transfectadas con TF y TFPI
- Actividad neutralizante de TFPI en plasma (tiempo de protrombina diluida)
- Dinámica del coágulo medida en plasma humano (Potencial de trombina endógena; ETP) y en sangre completa humana (trombelastografía; TEG)
- Identificación de los epítopos inhibitorios específicos en TFPI soluble de longitud completa implicados en la unión de los anticuerpos monoclonales con las características anteriores

Purificación de los mAb

Los anticuerpos monoclonales se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

Ejemplo 2: Clonación y secuenciación de los mAb de ratón específicos anti-TFPI K3/C-terminal

Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera murinas de los anticuerpos anti-TFPI MuTFPI4F110, MuTFPI22F66 y MuTFPI22F71.

El ARN total se extrajo de células de hibridoma mediante el uso del kit RNeasy-Mini de Qiagen y se usó como molde para la síntesis de ADNc. El ADNc se sintetizó en una reacción 5'-RACE mediante el uso del kit de amplificación SMART™ RACE ADNc de Clontech. La posterior amplificación dirigida de las secuencias HC y LC se realizó por PCR mediante el uso de polimerasa Phusion Hot Start (Finnzymes) y la mezcla de cebadores universales (UPM) incluida en el kit SMART™ RACE como cebador directo. La secuencia del cebador inverso usado para la amplificación de HC (dominio VH) se proporciona en la SEQ ID NO: 16. La secuencia del cebador inverso usado para la amplificación de LC (dominio VL) de MuTFPI22F66 y MuTFPI22F71 se proporciona en la SEQ ID NO: 17. La secuencia del cebador inverso usado para la amplificación de LC de MuTFPI4F110 se proporciona en la SEQ ID NO: 18.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel, se extrajeron mediante el uso del kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification de GE Healthcare Bio-Sciences y se clonaron para la secuenciación mediante el uso de un kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR y un TOP10 químicamente competente *E.coli* (Invitrogen). La PCR de colonia se realizó en colonias seleccionadas mediante el uso de una mezcla AmpliTaq Gold Master de Applied Biosystems y cebadores M13uni/M13rev. La limpieza del PCR de colonias se realizó mediante el uso de la mezcla de enzimas ExoSAP-IT (USB). La secuenciación se realizó en MWG Biotech, Martinsried Alemania mediante el uso de cebadores de secuenciación M13uni(-21)/M13rev(-29). Las secuencias se analizaron y anotaron mediante el uso del programa VectorNTI. Todos los kits y reactivos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se identificó un único LC kappa murino y un único HC murino, subclase IgG1 para cada uno de los hibridomas: MuTFPI4F110, MuTFPI22F66 y MuTFPI22F71. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos son como se muestran en el listado de secuencias; las secuencias peptídicas líderes no están incluidas.

Ejemplo 3: Tiempo de protrombina diluida (dPT)

Un análisis de protrombina diluida (PT) con plasma humano en combinación con tromboplastina humana diluida. El tiempo de coagulación en el plasma se midió tras la adición de concentraciones crecientes de anticuerpo monoclonal TFPI purificado con proteína A para buscar una reducción dependiente de la dosis del tiempo de coagulación con los mAb de interés.

Se mezclaron 120 µl de plasma empobrecido en FVIII estabilizado con citrato (Helena) con 5 µl de MuTFPI4F110 a varias concentraciones finales (0,0-1,0 nM) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La coagulación se midió mediante análisis ACL300 a 37 ºC. La coagulación se inició al mezclar 75 µl de plasma con 75 µl de reactivo que contenía $CaCl_2$ 0,02 M y dilución de factor tisular lipidado (TF) (Innovin®) 1:3750; 1:7500; o 1:15 000 en Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Como se muestra en la figura 1, MuTFPI4F110 acortó el tiempo de coagulación de una manera dependiente de la concentración en las tres concentraciones de TF.

Solo un fracción de TFPI presente en el plasma contiene un C-terminal intacto. Estos datos sugieren que la unión de un anticuerpo a esta fracción de TFPI de longitud completa promueve eficientemente la coagulación inducida por TF en plasma empobrecido en FVIII.

Ejemplo 4: Formación de trombina endógena

La actividad de trombina se evaluó continuamente después de la conversión del sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC.HCl (I-1140), de Bachem (Bubendorf, Suiza). La fluorescencia se midió en una placa de microtitulación de fluorómetro Fluorskan Ascent (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia) con longitudes de onda de excitación y emisión en 368 y 460 nm, respectivamente. Se usó un calibrador para permitir el cálculo de la cantidad de trombina formada y la corrección de las unidades de fluorescencia relativa obtenida para los efectos del filtro interno y el consumo del sustrato fluorogénico. Además, se restó la contribución a la conversión del sustrato mediante el complejo trombina-2-macroglobulina (9). Estas correcciones se realizaron automáticamente por medio del programa informático de trombograma automatizado (CAT) calibrado proporcionado por Synapse BV (Maaestricht, Holanda). Finalmente, se tomó la primera derivada de los datos que produjeron la curva de generación de trombina, lo que permitió el cálculo del área total bajo la curva, el potencial de trombina endógena (ETP).

El efecto de MuTFPI4F110 sobre la generación de trombina en plasma empobrecido en FVIII suplementado con PS/PC 10 µM se estudia en la figura 2. La activación de la coagulación por recalcificación y adición de Innovin® a una dilución final de 1/50 000 no indujo una generación de trombina medible en ausencia de anti-TFPI. En contraste, la generación de trombina se produjo en presencia de MuTFPI4F110 10 nM. Después de un aumento inicial, la concentración de trombina alcanzó un nivel de estado estable de aproximadamente 2 nM.

MuTFPI4F110 se estudió en presencia de niveles subnormales de FVIII, típicos de hemofilia A grave y moderada, para ver si es capaz de mejorar o normalizar la generación de trombina. Los resultados en la figura 3 muestran el efecto sobre la generación de trombina inducida por TF al reponer el plasma empobrecido en FVIII con 0-2 IU/ml de rFVIII (REFacto®) en ausencia y presencia de MuTFPI4F110 10 nM. La generación de trombina estuvo por debajo del nivel de detección en ausencia de rFVIII añadido y solo fue medible cuando se añadió rFVIII a un nivel superior a ~ 0,3 IU/ml de rFVIII. La suplementación con niveles más altos de rFVIII resultaron en un aumento dependiente de la dosis en el pico de actividad de trombina y acortó el tiempo de retraso para la generación de trombina. Los experimentos de generación de trombina en presencia de MuTFPI4F110 10 nM mostraron que la neutralización de TFPI en plasma empobrecido en FVIII resultó en una mejora de la generación de trombina, como se ilustra en la Figura 2, a una resolución más alta. Después de un tiempo de retraso de aproximadamente 13 minutos, la concentración de trombina aumentó y alcanzó un nivel de estado estacionario de aproximadamente 2 nM. La adición de rFVIII a niveles superiores que aproximadamente 0,05 IU/ml cambió este patrón e indujo un pico adicional de trombina transitoria en la parte superior del nivel basal de estado estacionario inducido por MuTFPI4F110 solo. Los resultados mostraron que MuTFPI4F110 dirigido hacia el C-terminal de TFPI solo promueve el inicio de la coagulación y, en combinación con niveles subóptimos de FVIII, también mejora la generación de un estallido de trombina.

Ejemplo 5: Mediciones por trombelastografía (TEG)

El plasma empobrecido en FVIII estabilizado con citrato (Helena) se suplementó con (concentraciones finales): 0,12 pM TF (Innovin®, 1:50 000), 150 000 plaquetas lavadas/µl y varias concentraciones (0,0; 0,005; 0,05; 0,01 y 1,0 U/ml) de FVIII recombinante (ReFacto®). La coagulación en ausencia o presencia de MuTFPI4F110 10 nM se inició cuando se transfirieron 320 µL de esta premezcla a un vaso de tromboelastografía que contenía 20 µL de $CaCl_2$ 0,2 M. La traza de TEG se siguió continuamente durante hasta 120 min (analizador TEG de serie 5000, Haemoscope Corporation, Niles, IL, EE.UU). Se registraron las siguientes variables de TEG: Tiempo R (tiempo de coagulación, es decir, el tiempo desde el inicio de la coagulación hasta que se obtuvo una amplitud de 2 mm), ángulo α (desarrollo de coágulos medido como el ángulo entre el valor de R y el punto de inflexión del trazo de TEG), K (velocidad de la cinética del coágulo para alcanzar un cierto nivel de resistencia del coágulo, amplitud = 20 mm), y MA (amplitud máxima del trazo de TEG que refleja la resistencia mecánica máxima del coágulo).

Los resultados mostraron que MuTFPI4F110 mejoró la formación de coágulos inducida por TF, es decir, acortó el tiempo de coagulación (valor R) y mejoró la velocidad de desarrollo de coágulos (valor de ángulo) tanto en ausencia de rFVIII como a bajas concentraciones de rFVIII, correspondientes a hemofilia grave y moderada.

Ejemplo 6: Análisis FACS

La línea celular EAHy926WT inmortalizada de tipo endotelial humana positiva para TFPI (derivada de células endoteliales de vena umbilical) se usó como un control positivo para la unión de TFPI unido a membrana. Las células EAHy926AR resistentes a aerolisina no expresan TFPI en su superficie y se usaron como un control negativo.

La tinción con anticuerpos anti TFPI y el correspondiente anticuerpo de control de isotipo hzATNP se realizó de la siguiente manera: Se añadieron preparaciones de la línea celular lavada (50 000 células por pocillo) a placas de 96 pocillos (Greiner, núm. de catálogo 65021) junto con 50 µl de anticuerpo TFPI diluido o control de isotipo en titulación proporcionando concentraciones finales de 5 µg/ml. Las preparaciones celulares se incubaron después a 4 grados

Celsius durante 1 hora. Después de la incubación y el lavado (tampón PBS con suero de ternera fetal al 5 %, centrifugar durante 5 minutos a 200 g), se añadió el anticuerpo secundario antihumano marcado con RPE (diluido en tampón PBS 1:200) y se incubó durante otra 1 hora a 4 grados Celsius. Finalmente, las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído (paraformaldehído al 1 % en peso (p/v)) y se analizaron en el citómetro de flujo dentro de 36 horas. En la figura 5, se muestra la unión de anticuerpos anti-TFPI específicos C-terminales (4F100 y 4F110) y el anticuerpo de control de isotipo hzATNP (0,5 µg/ml) a EAHy926WT y EAHy926AR.

Aquí está claro que los anticuerpos anti-TFPI dirigidos contra el C-terminal de TFPI no se unen a TFPI anclado a través de GPI expresado por la línea celular endotelial EAHy926WT, mientras que los anticuerpos contra Kunitz 2 se unen selectivamente a EAHy926WT y no a la línea celular negativa a TFPI resistente a aerolisina EAHy926AR.

Ejemplo 7: ELISA

El efecto de truncar la cola C-terminal de TFPI sobre la afinidad de unión de TFPI a MuTFPI22F66, MuTFPI22F71, MuTFPI22F74, MuTFPI22F79 y MuTFPI22F132 se analizó mediante ELISA o análisis de unión en tiempo real, con el uso de la plataforma ForteBio. Las variantes de TFPI, que eran TFPI de tipo salvaje (wt) (SEQ ID NO: 1) o mutantes truncados de TFPI que abarcan los aminoácidos 1-239 (SEQ ID NO: 2), 1-240 (SEQ ID NO: 22), 1-241 (SEQ ID NO: 23), 1-242 (SEQ ID NO: 24), 1-243 (SEQ ID NO: 25), 1-244 (SEQ ID NO: 26) o 1-245 (SEQ ID NO :3), se expresaron en células HEK293-F. Los ELISA, o los análisis de unión en tiempo real, se llevaron a cabo mediante el uso del medio acondicionado de los cultivos celulares.

Las concentraciones de TFPI wt y los mutantes truncados de TFPI en el medio acondicionado se estimaron mediante un ELISA que une TFPI K1-K2 (anti-TFPI de cabra, de la empresa) y K2 (MAb4F36, de la empresa). La unión a estos anticuerpos no se afecta por los truncamientos. Alternativamente, el MAb4F36 marcado con biotina se capturó en puntas de BioSensor recubiertas con estreptavidina (ForteBio) y se usó para las estimaciones de concentración.

En la configuración del ELISA, el efecto de las mutaciones en la capacidad de TFPI para unirse a MuTFPI22F66, MuTFPI22F71, MuTFPI22F74, MuTFPI22F79 o MuTFPI22F132 se analizó mediante el uso de cada uno de los MAb enumerados como anticuerpo de captura y mediante el uso de MAb4F36 para la detección. La unión directa de las variantes de TFPI a MuTFPI22F66, MuTFPI22F71, MuTFPI22F74, MuTFPI22F79 y MuTFPI22F132 marcados con biotina, capturados en puntas de BioSensor recubiertas con estreptavidina (ForteBio), se midió mediante el uso de la plataforma ForteBio.

La Figura 7 refleja el efecto de los truncamientos calculado, en relación con el nivel de expresión y con relación a wt. Se demostró que la unión de mAb 4F110 a las tres formas truncadas 1-243, 1-244 y 1-245 no se afectó, en comparación con su unión a TFPI de longitud completa, mientras que la unión de mAb 22F74 a todas las formas de TFPI truncadas se redujo fuertemente. El resto de los anticuerpos probados se encuentran dentro de este intervalo.

Ejemplo 8: Inhibición neutralizante de TFPI de la actividad de FVIIa/TF/FXa en presencia de vesículas de PS/PC

Los materiales usados fueron tampón BSA (Hepes 50 mM; NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 5 mM, BSA 0,1 mg/ml, pH 7,4) EDTA: 50 mM y los reactivos enumerados en las tablas a continuación.

	ID de la muestra mAB	Serie	conc mg/ml	conc nM	Solución de trabajo nM	Factor de dilución
1	TFPI-22F66	BA002-2	2,2	14 667	400	36,7
2	TFPI-22F71	BA002-3	0,5	3333	400	8,3
3	TFPI-22F74	BA002-5	0,6	4000	400	10
4	TFPI-22F79	BA002-6	4,8	32 000	400	80
5	TFPI-22F132	BA002-7	5,2	34 667	400	86,7
6	TFPI-4F110	OP001	3,5	23 333	400	58,3

Reactivo	Serie - lote núm.	Conc.	Conc. final en pocillo
EDTA	MERCK 8418	0,5 M	
mAb			nM 50 12,5 3,13 0,78 0,2 0,05 0,01 0

FVIIa	LASa 13200-008 congelado en alícuotas almacenamiento -80 °C	27 µM	10 pM
vesículas	HTI Vesículas de fosfolípidos cat#PCPS-02 #W1115- 75 % PC - 25 % PS (0,02 % azida añadida)	2,0 mM	12,5 µm
S-2765	Cromogenix 82 1413 39 lote#N0574120 2010-50	35 mM	0,5 mM
FX	Enzima Research HXF 3064 A2L disuelta en 50 % glicerol 08-dic-2009 congelado en alícuotas almacenamiento -80 °C	34 µM	160 nM
TFPI Fl.	0172-0000-0001-6A almacenamiento en alícuotas -20 °C	21,9 µM	1 nM
TF (Innovin)	Dade Behring#B4212-50# vial disuelto en 10ml H2O 08-dic-2009, congelado en alícuotas almacenamiento -20 °C	6 nM	10 pM

Todos los componentes, en concentraciones finales como se indica en la tabla anterior, se añadieron juntos. Se añadieron 25 µl de FX y 25 µl de mAb TFPI en concentraciones variables a 25 µl de TFPI humano, 25 µl de FVIIa-TF (innovin) y vesículas PS/PC en pocillos de microtitulación. Las mezclas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de EDTA, seguido por 50 µl de S-2765. Las placas se mezclaron y leyeron durante 15 minutos a 405 nm en Spectramax. El 100 % de la actividad fue la actividad de FVIIa/TF/FX obtenida sin presencia de TFPI.

Los seis mAb TFPI C-terminales enumerados en la tabla anterior fueron capaces de neutralizar la inhibición de TFPI del complejo FVIIa/TF/FX en presencia de vesículas de PS/PC. Los anticuerpos también neutralizaron TFPI en ausencia de PS/PC.

Ejemplo 9: Análisis de la interacción de unión

El análisis de la interacción de unión se obtuvo por resonancia de plasmones de superficie en un Biacore 3000. La captura del anticuerpo monoclonal relevante a una concentración fija se obtuvo con anti-IgG de ratón inmovilizado. Se probaron diferentes concentraciones de TFPI. La determinación de las constantes de unión (k_{on}, k_{off}, K_D) se obtuvo asumiendo una interacción 1:1 del TFPI y el anticuerpo de interés.

ID del mAB	constante de unión de TFPI nM			
	TFPI humano	$TFPI_{161}$ humano	TFPI de conejo	$TFPI_{161}$ de conejo
MuTFPI22F66	0,6	-	3,76	-
MuTFPI22F71	0,8	-	0,18	-
MuTFPI22F74	nd	-	2,73	-
MuTFPI22F132	nd	-	0,1	-
MuTFPI4F110	0,002	-	-	-

La competencia de los diferentes mAb para unirse al TFPI cuando se unía al mAb 4F110 se obtuvo por inmovilización del mAb 4F110 en un chip CM5 seguido por la unión de TFPI 50 nM seguido por concentraciones variables de los mAb (22F66, 22F71, 22F74, 22F79, 22F132, 22F158, 22F174, 4F110) para ser probado para la competencia. Los resultados se muestran en la tabla a continuación. La regeneración del chip se obtuvo mediante glicina 10 mM, pH 1,7.

ID del mAb	*Competencia con mAB 4F110 para la unión a TFPI*
TFPI-22F66	SÍ
TFPI-22F71	SÍ
TFPI-22F74	NO
TFPI-22F79	NO
TFPI-22F132	NO
TFPI-22F158	SÍ
TFPI-22F174	SÍ
TFPI-4F110	SÍ

Los mAb C-terminales se dividen en dos grupos con respecto a la competencia con mAb 4F110. Los anticuerpos en ambos grupos muestran actividad neutralizante de TFPI.

Ejemplo 10: Determinación de epítopos mediante modelado comparativo

Los modelos de epítopos se generaron mediante el programa de computadora disponible comercialmente, Modeller [N. Eswar, M. A. Marti-Renom, B. Webb, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30, 2006] basado en estructuras cristalográficas de rayos X publicadas de TFPI1-2. Para el TFPI1-3, se encontró que los residuos con una accesibilidad relativa superior al 40 % eran: 186-187, 190, 192-208, 213, 215-220, 225-228, 230-234 y 236-237. Para el C-terminal, los residuos 240-276 tenían una accesibilidad relativa mayor al 40 %.

Ejemplo 11: Ensayo de actividad variante del factor VIIa (Ensayo de hidrólisis *In vitro*)

El Factor VIIa natural (de tipo salvaje) y la variante del Factor VIIa (ambos denominados, de aquí en adelante, como "Factor VIIa") se analizan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-*p*-nitroanilida (S-2288, Cromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, se añade al Factor VIIa (concentración final 100 nM) en Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 5 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. Se mide continuamente la absorbancia a 405 nm en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo blanco que no contiene enzima, se usa para calcular la relación entre las actividades de la variante y del Factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Relación} = (A_{405\ nm}\ \text{Variante del Factor VIIa})/(A_{405\ nm}\ \text{Factor VIIa de tipo salvaje}).$$

Ejemplo 12: Ensayo de actividad variante del factor VIIa (Ensayo de proteólisis *In vitro*)

El Factor VIIa natural (de tipo salvaje) y la variante del Factor VIIa (ambos denominados, de aquí en adelante, como "Factor VIIa") se analizan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El Factor VIIa (10 nM) y el Factor X (0,8 microM) se incuban durante 15 min en 100 microlitros de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, CaCl2 5 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. La escisión del Factor X se detiene después mediante la adición de 50 l de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, EDTA 20 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. La cantidad de Factor Xa generado se mide mediante la adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-*p*-nitroanilida (S-2765, Cromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. Se mide continuamente la absorbancia a 405 nm en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo blanco que no contiene FVIIa, se usa para calcular la relación entre las actividades proteolíticas de la variante y del Factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Relación} = (A_{405\ nm}\ \text{Variante del Factor VIIa})/(A_{405\ nm}\ \text{Factor VIIa de tipo salvaje}).$$

Ejemplo 13: Ensayo de actividad del Factor VIIIa (ensayo cromogénico)

La actividad del FVIII (FVIII:C) del compuesto rFVIII se evalúa en un ensayo cromogénico del FVIII mediante el uso de reactivos de Coatest SP (Cromogenix) de la manera siguiente: las muestras de rFVIII y un estándar de FVIII (por ejemplo, rFVIII de tipo salvaje purificado calibrado frente al estándar internacional 7mo de FVIII de NIBSC) se diluyen en tampón de ensayo Coatest (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1 %, pH 7,3, con conservante). Se añaden por duplicado cincuenta µl de las muestras, estándares y control negativo del tampón a placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc). El reactivo del factor IXa/factor X, el reactivo fosfolípido y $CaCl_2$ del kit Coatest SP se mezclan 5:1:3 (vol:vol:vol) y 75 µl de esto se añade a los pocillos. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añaden 50 µl de la mezcla sustrato del factor Xa S-2765/inhibidor de trombina I-2581 y los reactivos se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de que se añadan 25 µl de ácido cítrico 1 M, pH 3. La absorbancia a 415 nm se mide en un lector de placas de microtitulación SpectraMax (Molecular Devices) con absorbancia a 620 nm usada como longitud de onda de referencia. El valor para el control negativo se sustrae de todas las muestras y se prepara una curva de calibración mediante regresión lineal de los valores de absorbancia graficados frente a la concentración de FVIII. La actividad específica se calcula al dividir la actividad de las muestras con la concentración de proteína determinada por HPLC. La concentración de la muestra se determina mediante la integración del área bajo el pico en el cromatograma correspondiente a la cadena ligera y mediante comparación con el área del mismo pico en un análisis paralelo de un rFVIII no modificado de tipo salvaje, donde la concentración se determina mediante análisis de aminoácidos.

Ejemplo 14: Ensayo de actividad del Factor VIIIa (ensayo de coágulos en una etapa)

La actividad del FVIII (FVIII:C) de los compuestos rFVIII se evalúa adicionalmente en un ensayo de coágulos de FVIII en una etapa de la manera siguiente: las muestras del rFVIII y un estándar del FVIII (por ejemplo, rFVIII de tipo salvaje purificado calibrado contra el 7mo estándar internacional del FVIII de NIBSC) se diluyen en tampón de HBS/BSA (hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 con BSA al 1 %) a aproximadamente 10 U/ml, seguido de dilución de 10 veces en plasma deficiente de FVIII que contiene VWF (Dade Behring). Las muestras se diluyen posteriormente en tampón HBS/BSA. El tiempo del coágulo APTT se mide mediante el uso de un instrumento ACL300R o ACL5000 (Instrumentation Laboratory) mediante el uso del programa de factor único. El plasma deficiente de FVIII con VWF (Dade Behring) se usa como plasma de ensayo y SynthAsil, (HemosIL™, Instrumentation Laboratory) como reactivo aPTT. En el instrumento de coágulo, la muestra o estándar diluido se mezcla con plasma deficiente en FVIII y los reactivos aPTT a 37 ºC. Se añade cloruro de calcio y se determina el tiempo hasta la formación de coágulos mediante la medición de la turbidez. El FVIII:C en la muestra se calcula basado en una curva estándar de los tiempos de formación de coágulos de las diluciones del estándar del FVIII.

Todos los encabezamientos y sub-encabezamientos se usan en la presente solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en la presente, está destinado meramente a ilustrar mejor la invención y no constituye una limitación sobre el alcance de la invención, a menos que se indique de cualquier otra manera. Ningún lenguaje en la descripción debe interpretarse como indicativo de ningún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones adjuntas a la misma, según lo permitido por la ley aplicable.

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Anticuerpos que son capaces de unirse específicamente al inhibidor de la vía del factor tisular

<130> 8201

<140> EP10167911.6
<141> 2010-06-30

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 276
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
50 55 60
Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

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

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

Val Lys Asn Met
275

<210> 2
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TFPI truncado (1-239)

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

<210> 3
<211> 245
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TFPI truncado (1-245)

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

Lys Gly Phe Ile Gln
245

<210> 4
<211> 354
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 4
caggtccaac tgcagcagtc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagttg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcatc agttactata tgtactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaatccta gcaatggtga tactaacctc 180

aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagtatac 240

atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagatgggat 300

aggttcgacg gttttgttta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 5
<211> 118

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr Asn Leu Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 6
<211> 324
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 6

gaaacaactg tgacccagtc tccagcatcc ctgtccatgg ctataggagg aaaagtcacc 60

atcagatgca taatcagcac taatattgat gatgatataa actggtacca gcagaagcca 120

ggggaacctc ctaagctcct tatttcagaa ggcaatactc ttcgtcctgg agtcccatcc 180

cgattctcca gcagtggcta tggtacagat tttgttttta caattgaaaa catgctctca 240

gaagatgttg cagattacta ctgtttgcaa agtgatgact tgccatacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

Gly Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Ile Ser Thr Asn Ile Asp Asp Asp
20 25 30

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

Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 8
<211> 351
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 8

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggagcttc aatgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacccca tgaactgggt gaggcagagc 120

catggaaaga accttgagtg gattggactt attaatcctt acaatggtga tactactttc 180

aaccagaaat tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

atggaactcc tcagtctgac ttctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagggacg 300

tatgaatatg ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Phe Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 10
caaattgttc tcacccagtc tccaacaatc atgtctgcat ctccagggga gagagtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtattt tacatgcact ggtaccagca gaagccaggg 120

tcctccccca gactcctgat ttatgacaca tccatcctgt cttctggagt ccctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagacgaat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagttacc ctctcacgtt cggtgctggg 300

accaagctgg agctgaaacg g 321

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Arg Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 12
<211> 366
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 12
gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc cgtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cagctttacc acctactgga tacactgggt taagcagagg 120

cctggacagg gtctagaatg gattggtgct attgatcctg gaaatagtga tgctacctac 180

agccagaagt tcaaggacaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgccttc 240

atggagctca acagcctgac aaatgatgac tctgcggtct attactgttc aagagaagtc 300

tactatggtt acgacgggga ctactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360

tcctca 366

<210> 13
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 14
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccagtga aagtgtcagt gttcatggta ctcatttaat gcactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa gctagaatct 180

ggagtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgagacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat ttctgtcagc aaagtattgg ggatccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgg 336

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val His
20 25 30

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

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

Gly Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 16

<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso

<400> 16
cttgccattg agccagtcct ggtgcatgat gg 32

<210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso

<400> 17
gttgttcaag aagcacacga ctg 23

<210> 18
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso

<400> 18
gctctagact aacactcatt cctgttgaag ctcttg 36

<210> 19
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

```
Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1               5                   10                  15
```

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 20
<211> 2332
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile

465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525
Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val

835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
885 890 895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
930 935 940

Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
945 950 955 960

Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
965 970 975

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
980 985 990

Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
995 1000 1005

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
1010 1015 1020

Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
1025 1030 1035

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
1040 1045 1050

Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
1055 1060 1065

Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
1070 1075 1080

Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
1085 1090 1095

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
1145 1150 1155

Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
1160 1165 1170

Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
1175 1180 1185

Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr

1190 1195 1200

Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
1205 1210 1215

Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
1220 1225 1230

Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
1235 1240 1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys
1250 1255 1260

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
1265 1270 1275

Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
1280 1285 1290

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr
1295 1300 1305

Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu
1310 1315 1320

Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr
1325 1330 1335

Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
1340 1345 1350

Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser
1355 1360 1365

Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala
1370 1375 1380

Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser
1385 1390 1395

Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser
1400 1405 1410

Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
1415 1420 1425

Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu
1430 1435 1440

Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
1445 1450 1455

Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys
1460 1465 1470

Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
1475 1480 1485

Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys
1490 1495 1500

Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
1505 1510 1515

Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
1520 1525 1530

Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg

1535 1540 1545

Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp
1550 1555 1560

Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu
1565 1570 1575

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys
1580 1585 1590
Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu
1610 1615 1620

Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln
1625 1630 1635

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
1640 1645 1650

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
1655 1660 1665

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
1670 1675 1680

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
1685 1690 1695

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
1700 1705 1710

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
1715 1720 1725

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe
1730 1735 1740

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
1745 1750 1755

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
1760 1765 1770

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1805 1810 1815

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1820 1825 1830

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
1835 1840 1845

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
1850 1855 1860

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1865 1870 1875

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu

1880 1885 1890

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
1895 1900 1905

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
1910 1915 1920

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
1925 1930 1935
Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
1940 1945 1950

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1955 1960 1965

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
1970 1975 1980

Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1985 1990 1995

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
2000 2005 2010

Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
2015 2020 2025

Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
2030 2035 2040

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
2045 2050 2055

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
2060 2065 2070

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
2075 2080 2085

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
2090 2095 2100

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
2105 2110 2115

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
2120 2125 2130

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
2135 2140 2145

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
2150 2155 2160

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
2165 2170 2175

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
2180 2185 2190

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
2195 2200 2205

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met

2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2270 2275 2280
Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
2330

<210> 21
<211> 414
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly

35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95
Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Pro Ala Val Pro
115 120 125

Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg
130 135 140

Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala
145 150 155 160

Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp
165 170 175

Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro
180 185 190

Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser
195 200 205

Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr
210 215 220

Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr
225 230 235 240

Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His
245 250 255

Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu
260 265 270

Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thsr Pro Ile Cys
275 280 285

Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly
290 295 300

Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu
305 310 315 320

Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu
325 330 335

Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe
340 345 350

His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His
355 360 365

Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp
370 375 380

Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val
385 390 395 400

Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

405 410

<210> 22
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

<210> 23
<211> 241
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

Lys

<210> 24
<211> 242
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
1 5 10 15
Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

Lys Gly

<210> 25
<211> 243
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

Lys Gly Phe

<210> 26
<211> 244
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys

130 135 140

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

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

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

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

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

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

Lys Gly Phe Ile

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente dentro de los aminoácidos 186-276 del TFPI (SEQ ID NO: 1), en donde la cadena pesada comprende:
   - una secuencia CDR1 de los aminoácidos 31 a 35 (SYYMY) de la SEQ ID NO: 5 y
   - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-66 (EINPSNGDTNLNEKFKS) de la SEQ ID NO: 5

   y
   - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 99-107 (WDRFDGFVY) de la SEQ ID NO: 5;

   y la cadena ligera comprende:
   - una secuencia CDR1 de los aminoácidos 24-34 (IISTNIDDDIN) de la SEQ ID NO: 7 y
   - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 50-56 (EGNTLRP) de la SEQ ID NO: 7 y
   - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 89-97 (LQSDDLPYT) de la SEQ ID NO: 7.

2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende las SEQ ID NO: 5 y 7.

3. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el anticuerpo es monoclonal.

4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es capaz de neutralizar la inhibición de TFPI de TF/FVIIa/FXa en presencia de fosfolípidos.

5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin reducir significativamente el recuento de plaquetas.

6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que reduce *in vivo* el tiempo de coagulación sin causar trombocitopenia transitoria.

7. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo es humanizado.

8. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-7.

9. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o la formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, para usar en el tratamiento de un sujeto con una coagulopatía.

10. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y otro agente que mejora la hemostasia, seleccionado de la lista que consiste en un polipéptido del Factor VIIa, un polipéptido del Factor VIII o un polipéptido del Factor IX, para usar en el tratamiento de un sujeto con un coagulopatía.

11. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un polipéptido del Factor VIII para el tratamiento de la hemofilia A.

12. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un polipéptido del Factor IX para el tratamiento de la hemofilia B.

13. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un polipéptido del Factor VIIa para el tratamiento de la hemofilia A o B con inhibidores.

Figura 1

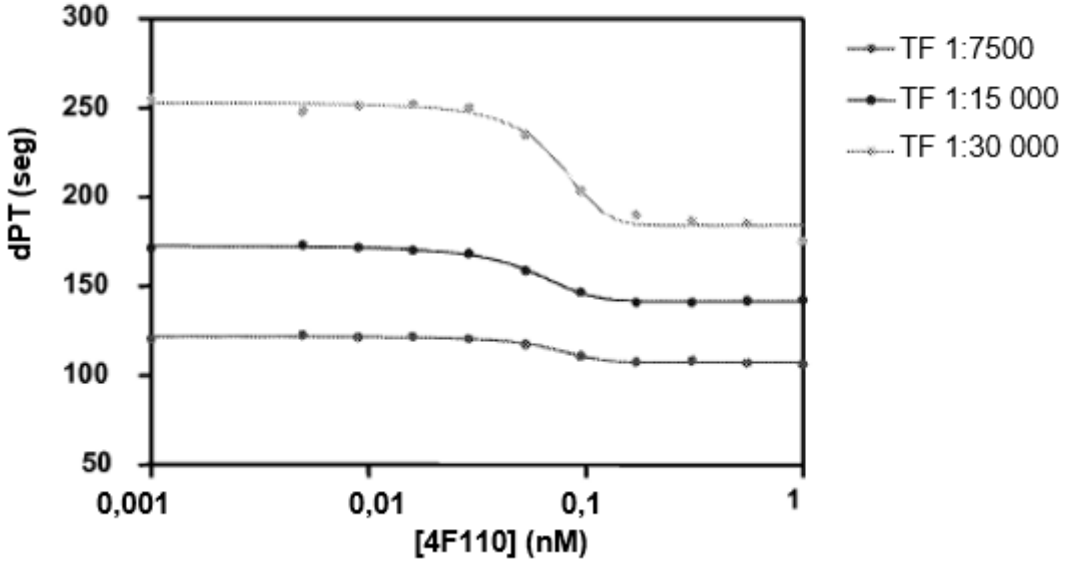

300
250
200
150
100
50
dPT (seg)
0,001
0,01
0,1
1
[4F110] (nM)
TF 1:7500
TF 1:15 000
TF 1:30 000

Figura 2

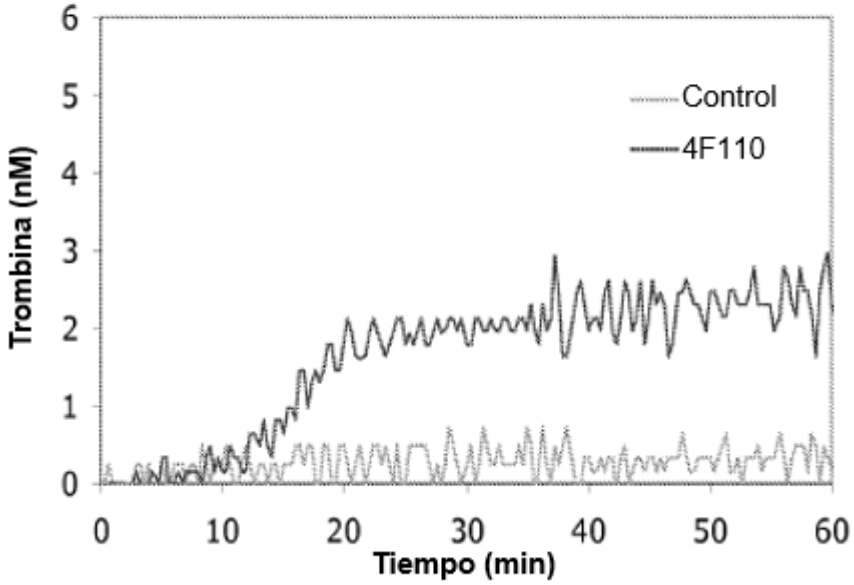

Control
4F110
Trombina (nM)
Tiempo (min)
0
1
2
3
4
5
6
0
10
20
30
40
50
60

Figura 3

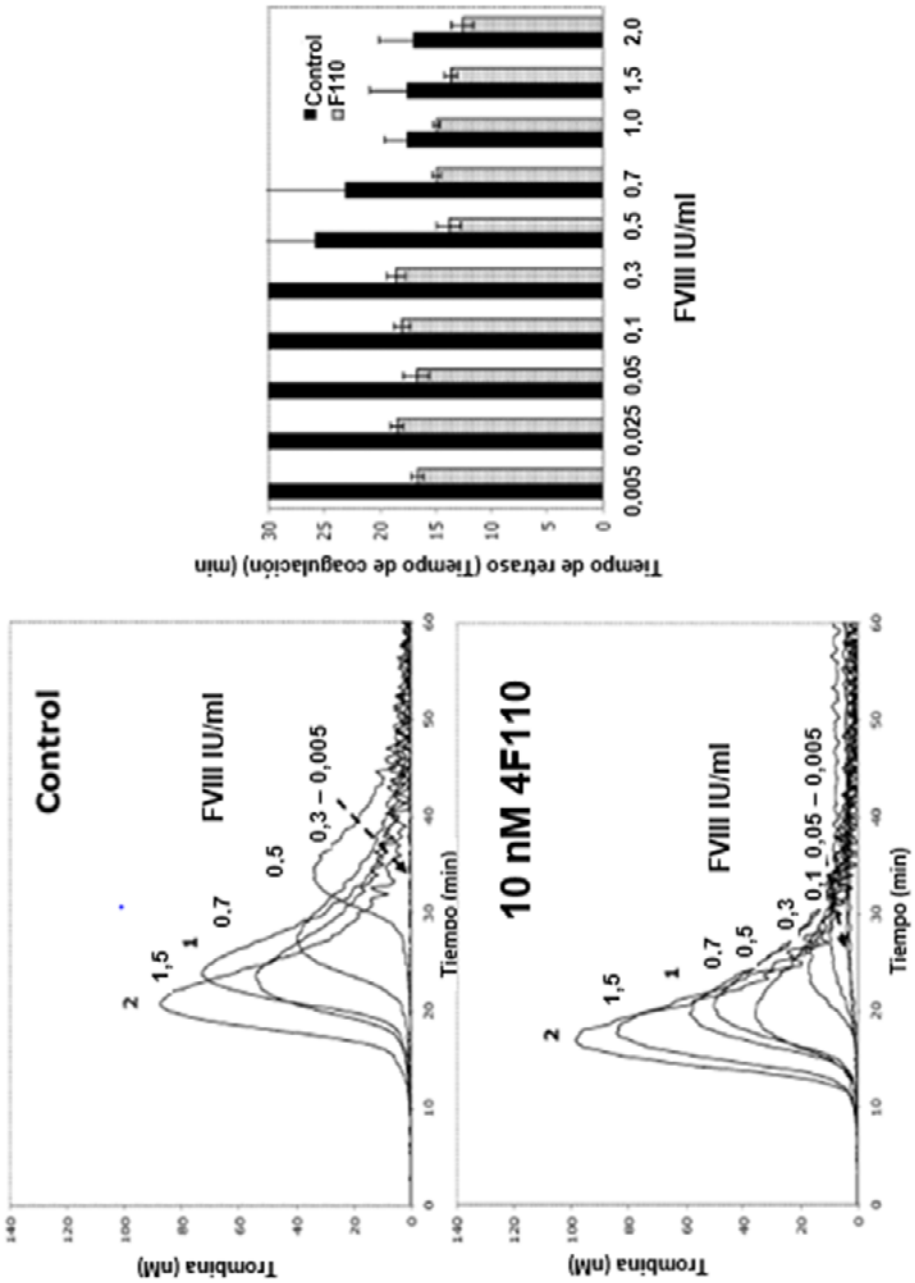

Control
FVIII IU/ml
2
1,5
1
0,7
0,5
0,3 – 0,005
Trombina (nM)
Tiempo (min)
10 nM 4F110
FVIII IU/ml
2
1,5
1
0,7
0,5
0,3
0,1 0,05 – 0,005
Trombina (nM)
Tiempo (min)
Tiempo de retraso (Tiempo de coagulación) (min
Control
F110
0,005 0,025 0,05 0,1 0,3 0,5 0,7 1,0 1,5 2,0
FVIII IU/ml

Figura 4

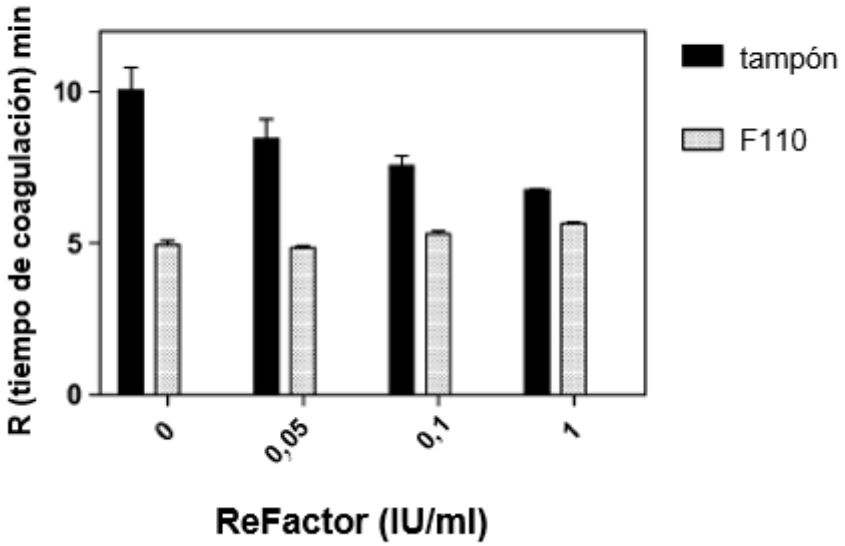

R (tiempo de coagulación) min
10
5
0
0
0,05
0,1
1
ReFactor (IU/ml)
tampón
F110

Figura 4 cont.

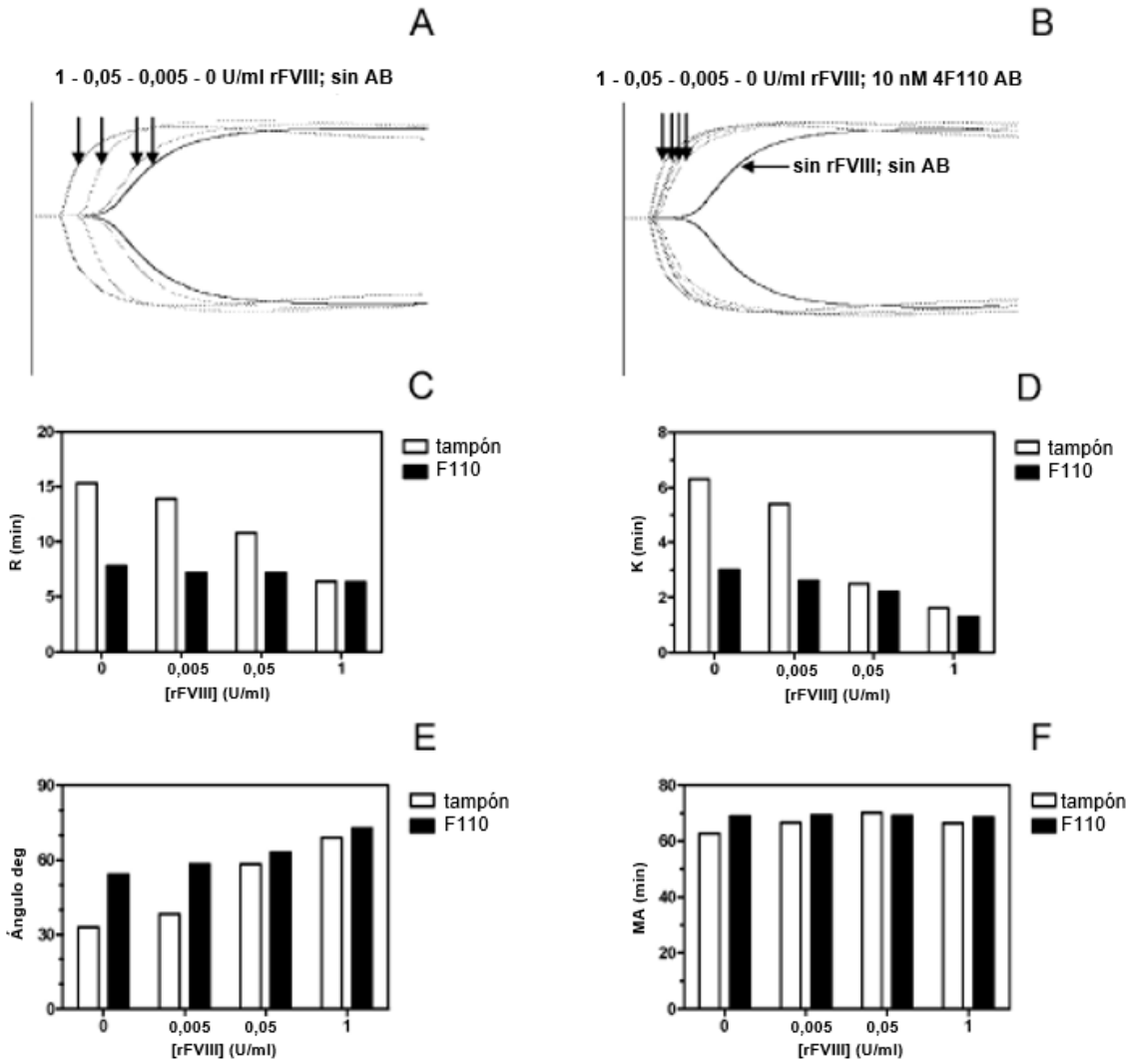


Figura 5

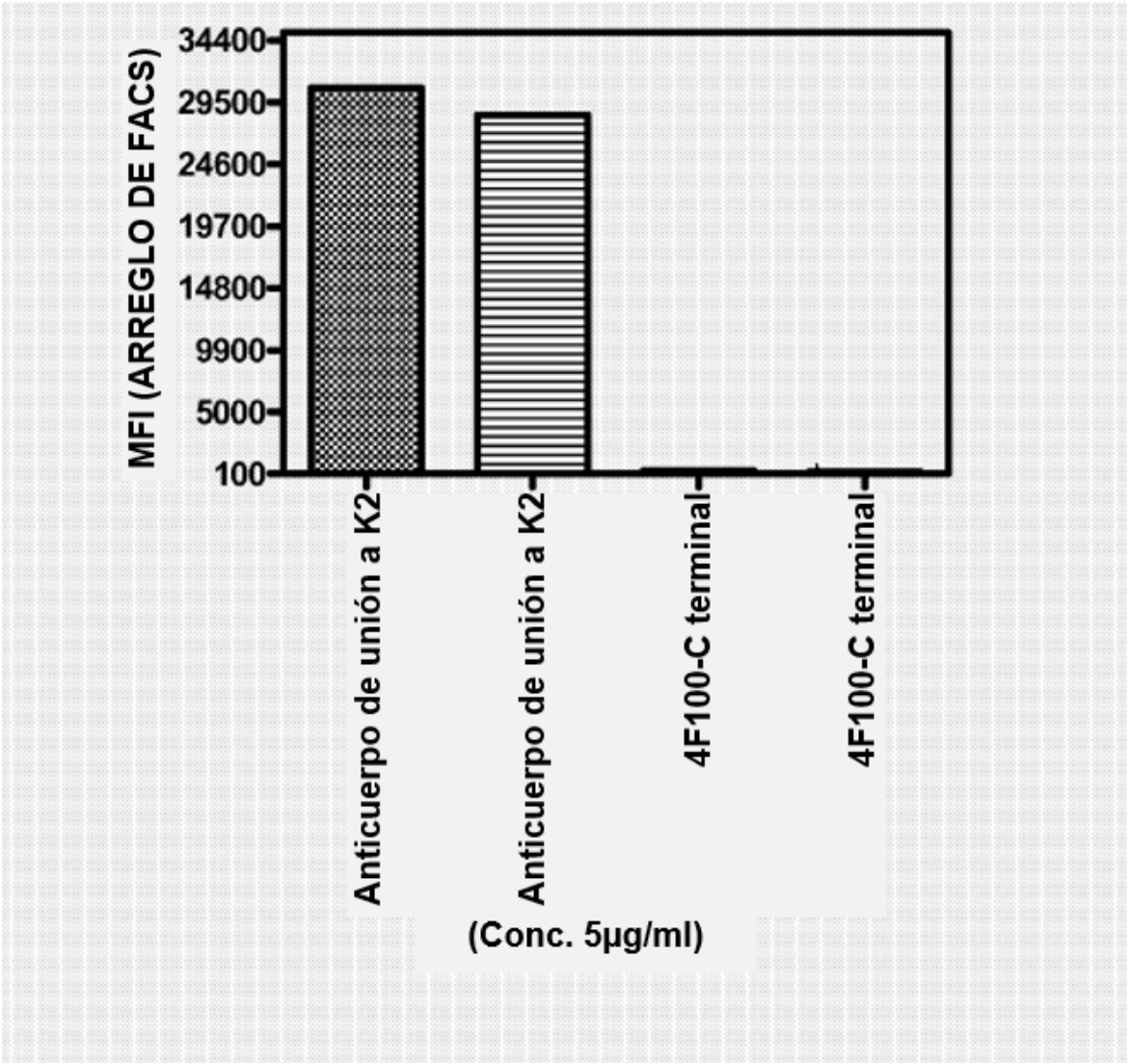

MFI (ARREGLO DE FACS)
34400
29500
24600
19700
14800
9900
5000
100
Anticuerpo de unión a K2
Anticuerpo de unión a K2
4F100-C terminal
4F100-C terminal
(Conc. 5µg/ml)

Figura 6

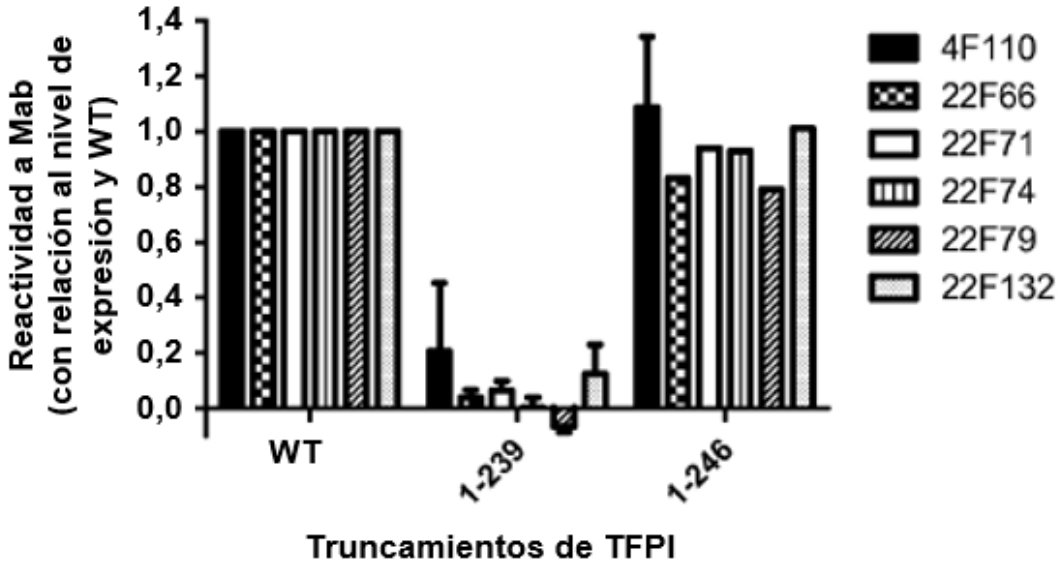

Reactividad a Mab
(con relación al nivel de
expresión y WT)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
WT
1-239
1-246
Truncamientos de TFPI
4F110
22F66
22F71
22F74
22F79
22F132

Figura 7

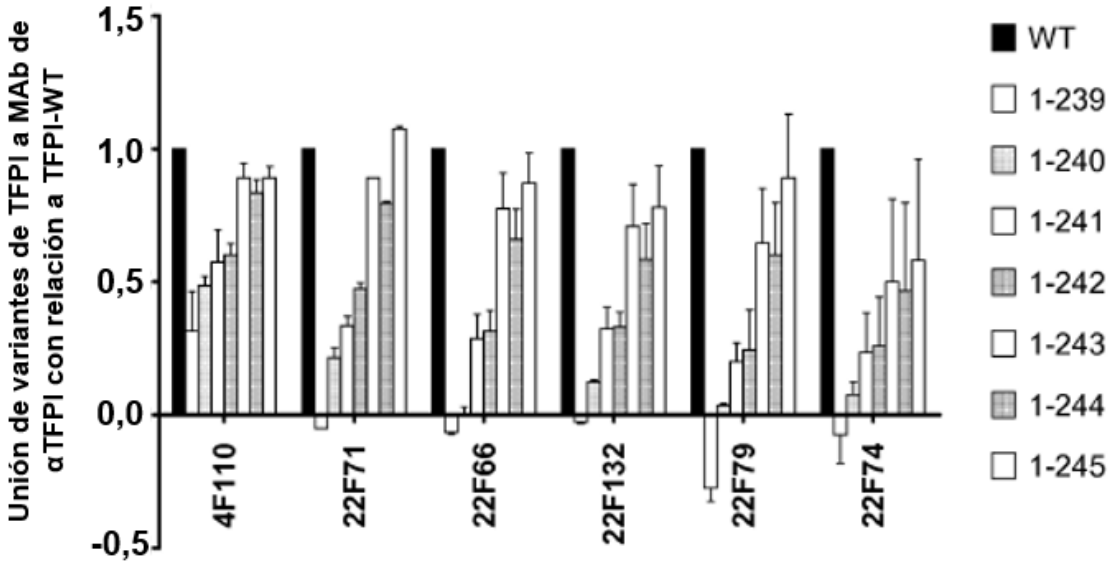

Unión de variantes de TFPI a MAb de αTFPI con relación a TFPI-WT
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
4F110
22F71
22F66
22F132
22F79
22F74
WT
1-239
1-240
1-241
1-242
1-243
1-244
1-245

Figura 8

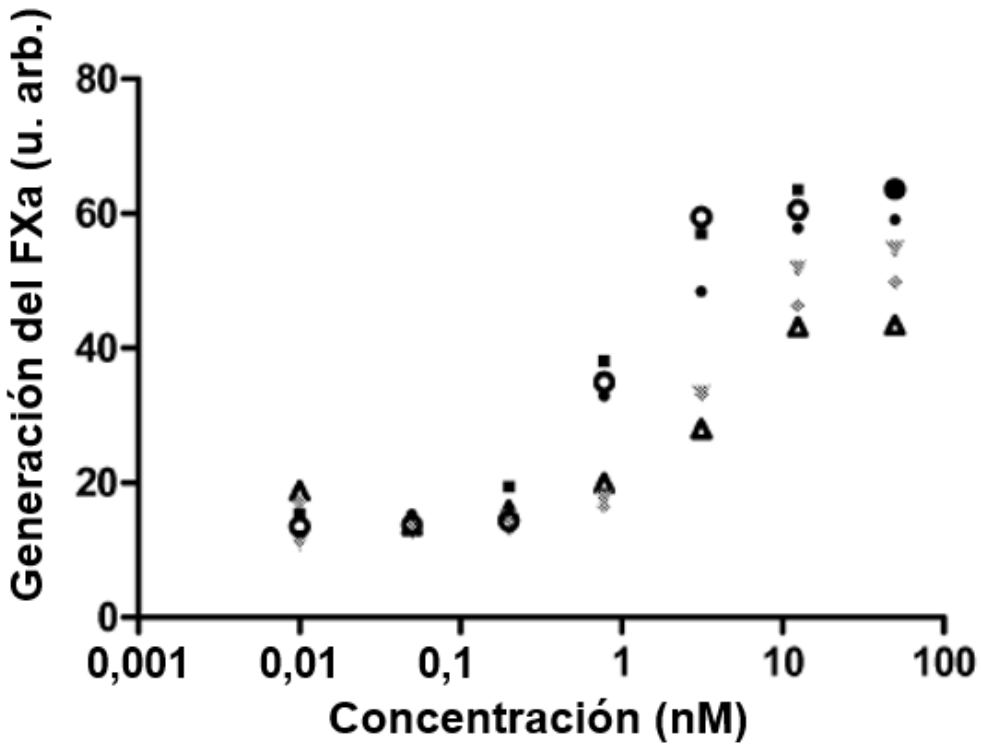
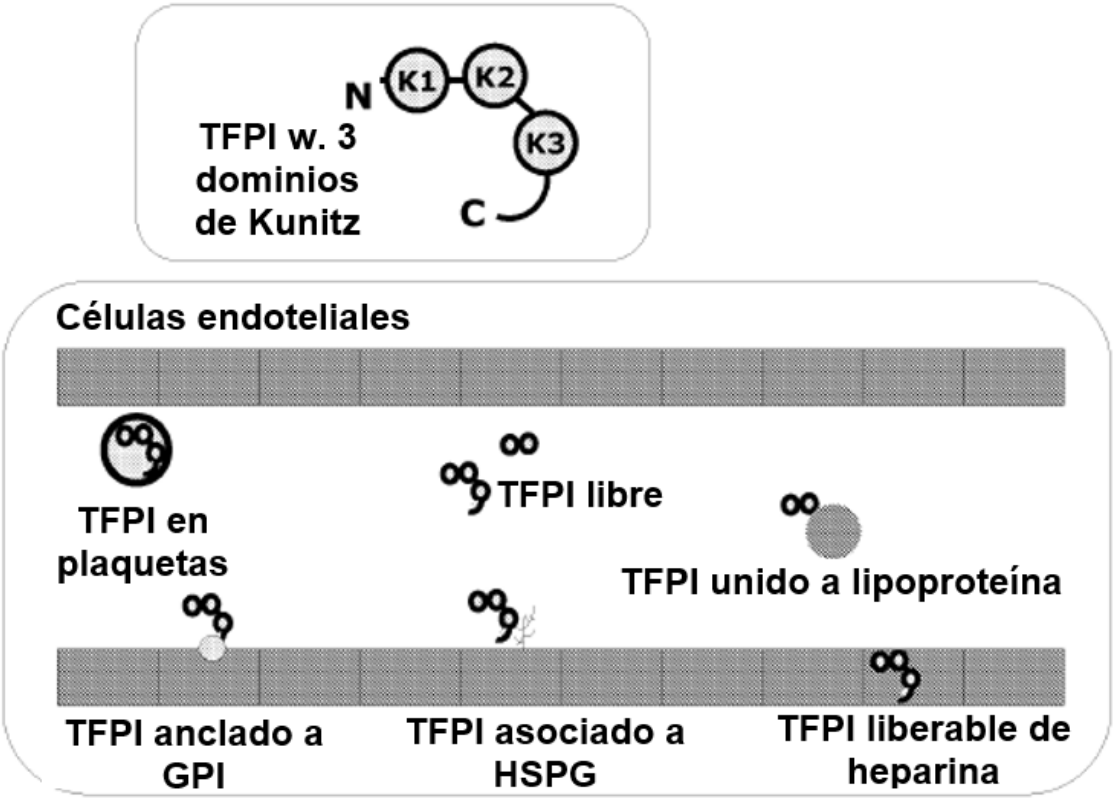

Generación del FXa (u. arb.)
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Concentración (nM)

Figura 9


N
K1
K2
K3
C
TFPI w. 3 dominios de Kunitz
Células endoteliales
TFPI en plaquetas
TFPI libre
TFPI unido a lipoproteína
TFPI anclado a GPI
TFPI asociado a HSPG
TFPI liberable de heparina