



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION
PCT- FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

22. TITULO **ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL
INHIBIDOR DE LA RUTA DEL FACTOR TISULAR
(TFPI)**

CLASIFICACION
INTERNACIONAL

SOLICITANTES **BAYER HEALTHCARE LLC**

DOMICILIO **WHIPPANY, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA**

APODERADO **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

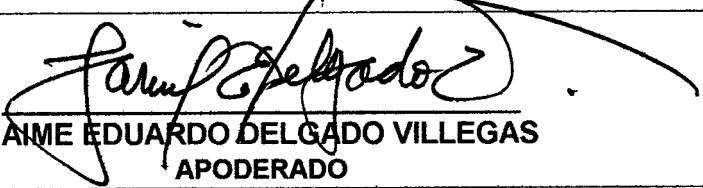
Bogotá, D.C.,



No. 13-233113- -00000-0000
Fecha: 2013-10-01 16:18:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/031538	Fecha 30/03/2012
Publicación Internacional No.		WO2012/135671 A2	Fecha 04/10/2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL INHIBIDOR DE LA RUTA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
BAYER HEALTHCARE LLC			[1]
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		100 Bayer Boulevard NJ 07981-0915	No. TELÉFONO
CIUDAD		WHIPPANY	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		NEW JERSEY	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. WANG,		Zhuozhi	CN
2. MURPHY,		John	US
3. MARQUARDT,		Tobias	DE
4. MOOSMAYER,		Dieter	DE
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
1. ESTADOS UNIDOS		CALIFORNIA 94030	Unit 383 1388 Broadway
2. ESTADOS UNIDOS		CALIFORNIA 94707	1139 The Alameda,
3. ALEMANIA			Viktoriastr. 81 42115
4. ALEMANIA			Wöhlerstr. 11 10115
5.			
6.			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
DELGADO VILLEGAS		JAIME EDUARDO	C.C. 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.J.
DIRECCIÓN		Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202	No. TELÉFONO 2444096
CIUDAD		BOGOTA D.C.	CORREO ELECTRÓNICO info@mdelaw.com
PAÍS		COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		US	61/471,101 01/04/2011
2.			

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
 JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS APODERADO			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 76		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 37		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 14		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SANTOS, Fernando
Law and Patents
800 Dwight Way
Berkeley, California 94710
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
20 September 2013 (20.09.2013)Applicant's or agent's file reference
BHC115001

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/031538International filing date (day/month/year)
30 March 2012 (30.03.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BAYER HEALTHCARE LLC
555 White Plains Road
Tarrytown, New York 10591
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

510-705-7725

Facsimile No.

501-705-7904

E-mail address

brkl_patents@bayer.com

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BAYER HEALTHCARE LLC
100 Bayer Boulevard
Whippany
NJ 07981-0915
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

510-705-7725

Facsimile No.

501-705-7904

E-mail address

brkl_patents@bayer.com

☒ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Laskowski Marek

Facsimile No. +41 22 338 89 95

e-mail pt04.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 04

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SANTOS, Fernando
Law and Patents
800 Dwight Way
Berkeley, California 94710
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
20 September 2013 (20.09.2013)Applicant's or agent's file reference
BHC115001

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/031538International filing date (day/month/year)
30 March 2012 (30.03.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

MOOSMAYER, Dieter
178 Muellerstrasse
13353 Berlin
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

MOOSMAYER, Dieter
Wöhlertstr, 11
10115 Berlin
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Laskowski Marek

e-mail pt04.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 04

Facsimile No. +41 22 338 89 95

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SANTOS, Fernando
Law and Patents
800 Dwight Way
Berkeley, California 94710
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

20 September 2013 (20.09.2013)

Applicant's or agent's file reference

BHC115001

International application No.

PCT/US2012/031538

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

30 March 2012 (30.03.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant☒ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

MARQUARDT, Tobias
178 Muellerstrasse
13353 Berlin
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person☐ the name☒ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

MARQUARDT, Tobias
Viktoriastr. 81
42115 Wuppertal
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☐ the International Searching Authority☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐

the International Preliminary Examining Authority

☒

the designated Offices concerned

☐

the elected Offices concerned

☐

other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Laskowski Marek

e-mail pt04.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 04

Facsimile No. +41 22 338 89 95

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION,
OBTENTION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SANTOS, Fernando
Law and Patents
800 Dwight Way
Berkeley, California 94710
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 17 April 2012 (17.04.2012)	
Applicant's or agent's file reference BHC115001	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2012/031538	International filing date (day/month/year) 30 March 2012 (30.03.2012)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 01 April 2011 (01.04.2011)
Applicant BAYER HEALTHCARE LLC et al	

The applicant is hereby notified of the date of receipt (or of obtaining by the International Bureau) of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to the date of receipt, **the priority document concerned was submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis)**. This Form replaces any previously issued notification concerning submission, transmittal or obtaining of priority documents.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
01 April 2011 (01.04.2011)	61/471,101	US	07 April 2012 (07.04.2012)

The letters "NR" denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis). Where the applicant has failed to either submit, request to prepare and transmit or obtain and transmit, or to request the International Bureau to obtain the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

An asterisk "*" next to a date of receipt, denotes a priority document submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a); the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b) or the request to the receiving Office or the International Bureau to obtain the priority document was made after the applicable time limit under Rule 17.1(b-bis)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Athina Nickitas-Etienne e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
Facsimile No. +41 22 338 89 95	

**ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL INHIBIDOR DE LA RUTA
DEL FACTOR TISULAR (TFPI)**

Zhuozhi Wang, John Murphy, Tobias Marquardt, Dieter Moosmayer

5 Presentación del listado de secuencias

El listado de secuencias asociado con esta solicitud se presenta en formato electrónico a través de EFS-Web y se incorpora al presente documento por referencia en la memoria descriptiva en su totalidad.

Campo de las realizaciones

- 10 Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados y sus fragmentos que se unen al inhibidor de la ruta del factor tisular humano (TFPI).

Antecedentes

- La coagulación sanguínea es un proceso mediante el cual la sangre forma coágulos estables para detener las hemorragias. El proceso implica una
- 15 serie de proenzimas y procofactores (o "factores de coagulación") que circulan en la sangre. Dichas proenzimas y procofactores interaccionan a través de varias rutas a través de las cuales se convierten, bien secuencialmente o simultáneamente, en la forma activada. En último término, el proceso da como
- 20 resultado la activación de la protrombina a trombina mediante el factor X activado (FXa) en presencia del factor Va, calcio iónico y plaquetas. La trombina activada induce a su vez la agregación de plaquetas y convierte el fibrinógeno en fibrina, que después se entrecruza mediante el factor XIII
- 25 activado (FXIIIa) para formar un coágulo.

- El proceso que conduce a la activación del factor X puede llevarse a
- 25 cabo mediante dos rutas distintas: la ruta de activación por contacto

(antiguamente conocida como la ruta intrínseca) y la ruta del factor tisular (antiguamente conocida como la ruta extrínseca). Anteriormente se creía que la cascada de la coagulación constaba de dos rutas de igual importancia unidas en una ruta común. Ahora se sabe que la ruta principal para la iniciación de la coagulación sanguínea es la ruta del factor tisular.

El factor X puede activarse mediante el factor tisular (TF) en combinación con el factor VII activado (FVIIa). El complejo de factor VIIa y su cofactor esencial, el TF, es un potente iniciador de la cascada de la coagulación.

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

De hecho, algunas pruebas experimentales preliminares han indicado que el bloqueo de la actividad del TFPI por anticuerpos frente al TFPI normaliza el tiempo de coagulación prolongado o acorta el tiempo de hemorragia. Por ejemplo, Nordfang y col. mostraron que el tiempo de protrombina diluido prolongado del plasma hemofílico se normalizaba después de tratar el plasma

con anticuerpos para el TFPI (Thromb. Haemost., 1991, 66(4): 464-467). De forma similar, Erhardtsen y col. mostraron que el tiempo de hemorragia en un modelo de conejo de hemofilia A se acortaba significativamente por anticuerpos anti-TFPI (Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1995, 6: 388-394). Estos estudios sugieren que la inhibición del TFPI por anticuerpos anti-TFPI puede ser útil para el tratamiento de la hemofilia A o B. En estos estudios se usó solamente anticuerpo anti-TFPI policlonal.

Se prepararon e identificaron anticuerpos monoclonales frente a TFPI humano recombinante (rhTFPI) usando técnicas de hibridoma. Véase Yang y col., Chin. Med. J., 1998, 111(8): 718-721. Se sometió a prueba el efecto del anticuerpo monoclonal sobre el tiempo de protrombina diluido (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT). Los experimentos mostraron que el anticuerpo monoclonal anti-TFPI acortaba el tiempo de coagulación de tromboplastina diluido del plasma deficiente en factor IX. Se sugiere que la ruta del factor tisular desempeña un papel importante, no sólo en la coagulación fisiológica, sino también en la hemorragia de la hemofilia (Yang y col., Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1997, 22(4): 297-300).

En consecuencia, se necesitan anticuerpos específicos para el TFPI para tratar enfermedades hematológicas y el cáncer.

En general, los anticuerpos terapéuticos para enfermedades humanas se han generado usando ingeniería genética para crear anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o totalmente humanos. Se mostró que los anticuerpos monoclonales humanos tenían un uso limitado como agentes terapéuticos debido a su corta semivida en suero, su incapacidad de desencadenar funciones efectoras humanas y la producción de anticuerpos

humanos anti-ratón (Brekke y Sandlie, "Therapeutic Antibodies for Human Diseases at the Dawn of the Twenty-first Century", *Nature* 2, 53, 52-62, ene. 2003). Se ha mostrado que los anticuerpos quiméricos dan lugar a respuestas de anti-anticuerpo quimérico humanas. Los anticuerpos humanizados minimizan adicionalmente el componente de ratón de los anticuerpos. Sin embargo, un anticuerpo totalmente humano evita por completo la inmunogenicidad asociada con elementos murinos. Por tanto, existe una necesidad de desarrollar anticuerpos totalmente humanos para evitar la inmunogenicidad asociada con otras formas de anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética. En particular, un tratamiento profiláctico crónico como el que sería necesario para el tratamiento de la hemofilia con un anticuerpo monoclonal anti-TFPI presenta un alto riesgo de desarrollo de una respuesta inmunitaria frente al tratamiento si se usa un anticuerpo con un componente murino o de origen murino, debido a la frecuente administración de dosis requerida y la larga duración del tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento de anticuerpos para la hemofilia A puede requerir una administración de dosis semanal durante toda la vida del paciente. Esto supondría una exposición continua del sistema inmunitario. Por tanto, existe la necesidad de proporcionar un anticuerpo totalmente humano para el tratamiento de anticuerpos para la hemofilia y deficiencias genéticas y adquiridas relacionadas o defectos en la coagulación.

Se han preparado anticuerpos terapéuticos a través de tecnología de hibridomas descrita por Koehler y Milstein en "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity", *Nature* 256, 495-497 (1975). Los anticuerpos totalmente humanos también pueden prepararse de

manera recombinante en procariotas y eucariotas. Se prefiere la producción recombinante de un anticuerpo en una célula huésped en lugar de la producción de hibridomas para un anticuerpo terapéutico. La producción recombinante tiene las ventajas de una consistencia del producto mayor, un
5 nivel de producción probablemente mayor y una fabricación controlada que minimiza o elimina la presencia de proteínas derivadas de animales. Por estos motivos, es deseable producir un anticuerpo anti-TFPI monoclonal de manera recombinante.

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

Sumario

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

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la formación del complejo de Fab A y el dominio de Kunitz 2 del TFPI mediante análisis de exclusión por tamaño.

La figura 2 representa una representación en dibujo de la interacción
25 entre el inhibidor de la ruta del factor tisular humano y uno de sus anticuerpos

(Fab A). El Fab A con los dominios variable ligero (V_L) y pesado (V_H) indicados se representa como la estructura inferior. El dominio de Kunitz 2 (KD2) del TFPI se representa como la estructura superior.

La figura 3 representa los restos clave del epítipo Asp102 (D102), Ile105 (I105), Arg107 (R107), el puente disulfuro Cys106-Cys130 y la unión del TFPI y la superficie del Fab A.

La figura 4 representa una superposición del complejo de TFPI - Fab A y un dominio de Kunitz 2 (KD2) unido a tripsina y muestra la exclusión de la unión simultánea del TFPI al factor Xa y al Fab A. El KD2 y el Fab A se muestran en un diagrama en colores, la tripsina se muestra como una superficie transparente. También se indica el impedimento estérico del Fab A y la tripsina.

La figura 5 representa la formación del complejo de Fab B y el dominio de Kunitz 1+2 del TFPI mediante análisis de exclusión por tamaño.

La figura 6 representa dos representaciones en dibujos que muestran la interacción entre el inhibidor de la ruta del factor tisular humano y uno de sus anticuerpos (Fab B) en un primer ángulo y en otro ángulo rotado 90 grados con relación al primer ángulo. El Fab B con los dominios variable ligero (V_L) y pesado (V_H) indicados se muestra en la parte inferior de la figura (sombreado en gris). El dominio de Kunitz 1 (KD1) del TFPI se muestra en blanco y el dominio de Kunitz 2 (KD2) del TFPI se muestra en negro.

La figura 7 representa los restos clave del epítipo Asp31 (D31), Asp32 (D32), Pro34 (P34), Lys36 (K36), Glu60 (E60), el puente disulfuro Cys35-Cys59 y la unión del dominio de Kunitz 1 del TFPI en la superficie del Fab B. También se muestra, aunque no se enumera, la unión del dominio de Kunitz 2.

La figura 8 representa dos ángulos de visión de la unión e interacción de los restos del epítipo Glu100 (E100), Glu101 (E101), Pro103 (P103), Ile105 (I105), Arg107 (R107), Tyr109 (Y109) del dominio de Kunitz 2 con el Fab B. La Arg107 interacciona con Gly33 (G33) y Cys35 (C35) del dominio de Kunitz 1.

5 La figura 9 representa una superposición del complejo de TFPI - Fab B y un complejo de BPTI, factor VIIa y factor tisular, y muestra la exclusión de la unión simultánea del TFPI al factor VIIa/factor tisular y al Fab B. El impedimento estérico del Fab B y el factor VIIa y del Fab B y el factor tisular se indican con flechas.

10 La figura 10 representa una superposición del complejo de TFPI - Fab B y un dominio de Kunitz 2 unido a tripsina y muestra la exclusión de la unión simultánea del TFPI al factor Xa y a Fab B. Se indican el impedimento estérico del Fab B y la tripsina y del dominio de Kunitz 1 unido al Fab B y la tripsina.

La figura 11 representa (A) una alineación de secuencias de las cadenas ligeras y pesadas del Fab A (SEC ID N°: 2 y 3) y del Fab C (SEC ID N°: 6 y 7) y
 15 (B) una superposición de la estructura de rayos X del TFPI - Fab A con modelos de homología del Fab C. (A) Los restos del parátipo están en negrita y resaltados. El resto de parátipo hc_Asn32 que difiere en el Fab A y el Fab C está marcado con un asterisco. (B) El dominio de Kunitz 2 (KD2) se muestra en
 20 negro en el dibujo. Las estructuras de Fab se muestran como cintas grises. El resto de parátipo hc_Asn32 se muestra como una varilla.

La figura 12 representa (A) una alineación de secuencias de las cadenas ligeras y pesadas del Fab B (SEC ID N°: 4 y 5) y del Fab D (SEC ID N°: 8 y 9) y
 (B) una superposición de la estructura de rayos X del TFPI - Fab B con
 25 modelos de homología del Fab D. (A) Los restos del parátipo están en negrita

y resaltados. Los restos del parátipo que difieren en el Fab B y el Fab D están marcados con un asterisco. (B) El dominio de Kunitz 1 (KD1) y el dominio de Kunitz 2 (KD2) se muestran en el dibujo en gris claro y negro, respectivamente. Las estructuras de Fab se muestran como cintas grises. Los restos del parátipo que difieren en Fab B y Fab C se muestran como varillas.

Descripción detallada

Definiciones

La expresión "inhibidor de la ruta del factor tisular" o "TFPI" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier variante, isoforma y especie homóloga del TFPI humano expresado de manera natural por células. En una realización preferida de la invención, la unión de un anticuerpo de la invención al TFPI reduce el tiempo de coagulación sanguínea.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo completo y a cualquiera de sus fragmentos de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas. El término incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo de IgG) que se produce de forma natural o se forma mediante procesos de recombinación de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales, o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento de anticuerpo, que mantiene la actividad de unión específica. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno que reconoce el anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TFPI se une a un epítipo del TFPI. La función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud

completa. Los ejemplos de fragmentos de unión que se engloban dentro del término "porción de unión a anticuerpo" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de dAb (Ward y col., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; (vii) minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (véase, por ejemplo, Ill y col., Protein Eng, 1997, 10:949-57); (viii) IgG de camello; y (ix) IgNAR. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos de recombinación, mediante un enlazador sintético que les permite producirse como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (scFv); véanse, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios se engloben dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y se analiza que los fragmentos sean útiles de la misma manera que lo son los anticuerpos intactos.

Además, se contempla que un fragmento de unión a antígeno pueda englobarse en un mimético de anticuerpo. El término "mimético de anticuerpo"

o "mimético" como se usa en el presente documento quiere decir una proteína que muestra unión similar a un anticuerpo pero es un anticuerpo alternativo más pequeño o una proteína que no es un anticuerpo. Tal mimético de anticuerpo puede comprenderse en un armazón. El término "armazón" se
5 refiere a una plataforma de polipéptido para el diseño de nuevos productos con funciones y características adaptadas.

El término "epítopo" se refiere a la zona o región de un antígeno con la cual se une o interacciona específicamente un anticuerpo, que en algunas realizaciones indica dónde está en contacto el antígeno con el anticuerpo. Por
10 el contrario, el término "parátopo" se refiere a la zona o región del anticuerpo en la que se une específicamente el antígeno. Se dice que los epítomos caracterizados por la unión competitiva se solapan si las uniones de los anticuerpos correspondientes son mutuamente excluyentes, es decir, la unión de un anticuerpo excluye la unión simultánea de otro anticuerpo. Se dice que
15 los epítomos son independientes (únicos) si el antígeno puede acomodar la unión de ambos anticuerpos correspondientes simultáneamente.

La expresión "anticuerpos competidores", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que se unen a aproximadamente, sustancialmente o esencialmente al mismo, o incluso al mismo, epítopo que un
20 anticuerpo frente al TFPI como se describe en el presente documento. "Anticuerpos competidores" incluye anticuerpos con especificidades de epítopo solapantes. Por tanto, los anticuerpos competidores pueden competir de forma eficaz con un anticuerpo como se describe en el presente documento por la unión al TFPI. Preferentemente, el anticuerpo competidor puede unirse al
25 mismo epítopo que el anticuerpo descrito en el presente documento. Desde un

punto de vista alternativo, el anticuerpo competidor tiene la misma especificidad de epítipo que el anticuerpo descrito en el presente documento.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "que inhibe la unión" y "que bloquea la unión" (por ejemplo, en referencia a la inhibición/bloqueo de la unión del ligando de TFPI al TFPI) se usan indistintamente y engloban la inhibición o el bloqueo tanto parcial como total. También se pretende que la inhibición y el bloqueo incluyan cualquier reducción medible de la afinidad de unión del TFPI a un sustrato fisiológico cuando está en contacto con un anticuerpo anti-TFPI en comparación con el TFPI que no está en contacto con un anticuerpo anti-TFPI, por ejemplo, el bloqueo de la interacción del TFPI con el factor Xa o el bloqueo de la interacción de un complejo de TFPI-factor Xa con factor tisular, factor VIIa o el complejo de factor tisular/factor VIIa en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 %.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad y afinidad de unión por un epítipo en particular. En consecuencia, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de

sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

Se pretende que un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiera a un anticuerpo que no tiene, sustancialmente, otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une al TFPI no tiene, sustancialmente, anticuerpos que se unen a antígenos diferentes del TFPI). Un anticuerpo aislado que se une a un epítipo, isoforma o variante del TFPI humano puede, no obstante, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especie del TFPI). Además, un anticuerpo aislado puede no tener, sustancialmente, otro material celular y/o sustancias químicas.

Como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente 10^5 M^{-1} y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es mayor, por ejemplo, al menos dos veces mayor, que su afinidad de unión por un antígeno no pertinente (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se usa en el presente documento, la expresión "alta afinidad" para un anticuerpo de IgG se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , en algunas realizaciones de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} , en algunas realizaciones de al menos

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

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

Como se usa en el presente documento, "sustituciones conservadoras" se refiere a modificaciones de un polipéptido que implican la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares que no dan como resultado la pérdida de una función biológica o bioquímica del polipéptido. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es aquella en la que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de

aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Se prevé que los anticuerpos de la presente invención puedan tener sustituciones de aminoácidos conservadoras y mantener aun así su actividad.

Para ácidos nucleicos y polipéptidos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean de forma óptima y se comparan, son idénticos, con inserciones o eliminaciones de nucleótidos o aminoácidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos o aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente el 85 %, preferentemente aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 % o 99,5 % de los nucleótidos o aminoácidos. De forma alternativa, existe homología sustancial para los ácidos nucleicos cuando los segmentos hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas para el complemento de la hebra. La invención incluye secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos que tienen una homología sustancial con las secuencias de

ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos específicas mencionadas en el presente documento.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que han de introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, tal como, sin limitación, el módulo AlignX™ de VectorNTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Para AlignX™, los parámetros de alineación múltiple por defecto son: penalización por apertura de hueco: 10; penalización por extensión de hueco: 0,05; intervalo de penalización por separación de hueco: 8; % de identidad por retraso en la alineación: 40. (pueden encontrarse más detalles en <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html>).

Otro procedimiento para determinar el mejor apareamiento general entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, a lo que también se hace referencia como alineación de secuencias global, puede determinarse usando el programa de ordenador CLUSTALW (Thompson y col., Nucleic Acids Research, 1994, 2(22): 4673-4680), que se basa en el algoritmo de Higgins y col., (Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), 1992, 8(2): 189-191). En una alineación de

22

secuencias, tanto la secuencia de consulta como la secuencia objeto son secuencias de ADN. El resultado de dicha alineación de secuencias global es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación de secuencias de ADN con CLUSTALW para calcular el porcentaje de identidad a través de alineaciones por apareamientos son: Matriz = IUB, k-tuple = 1, Número de diagonales principales = 5, Penalización por hueco = 3, Penalización por apertura de hueco = 10, Penalización por extensión de hueco = 0,1. Para alineaciones múltiples, los parámetros de CLUSTALW preferidos son los siguientes: Penalización por apertura de hueco = 10; Parámetro de extensión de hueco = 0,05; Intervalo de penalización por separación de hueco = 8; % de identidad por retraso en la alineación = 40.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se hace sustancialmente puro" cuando se purifica separándolo de otros componentes celulares con los que se asocia normalmente en el entorno natural. Para aislar un ácido nucleico, pueden usarse técnicas convencionales tales como las siguientes: tratamiento alcalino/SDS, bandeo con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica.

20 ***Anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos del TFPI específicos***

En el presente documento se proporcionan anticuerpos con unión específica al TFPI humano como se muestra en la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-TFPI inhiben la unión de un ligando de TFPI al TFPI. Por tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-TFPI pueden inhibir la actividad del TFPI.

Se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo comprende uno o más restos del dominio de Kunitz 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 3 o en la SEC ID N°: 5. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 2 y la cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 3. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 4 y la cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 5. En algunas realizaciones, también se contempla que el anticuerpo monoclonal aislado pueda comprender una cadena ligera o una cadena pesada con homología sustancial con las que se proporcionan. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal aislado que comprende la homología sustancial puede comprender una o más sustituciones conservadoras.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo comprende uno o más restos seleccionados de entre Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1 y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Glu100 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Glu101

de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Asp102 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Pro103 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly104 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Ile105 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Cys106 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Arg107 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly108 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Tyr109 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Lys126 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly128 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly129 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Cys130 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Leu131 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Gly132 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Asn133 de la SEC ID N°: 1.

En algunas realizaciones, el epítipo comprende los restos Ile105 y Asp102 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende los restos Ile105 y Leu131 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones el epítipo comprende los restos Ile105, Asp102 y Leu131 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende además el resto Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Cys106, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 o Asn133 de la SEC ID N°: 1.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo comprende dos bucles de aminoácidos enlazados por un puente disulfuro entre los restos Cys106 y Cys130 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende además uno o más restos seleccionados de entre Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el epítipo comprende el resto Ile105 de la SEC ID N°: 1. En otras realizaciones, el epítipo comprende el resto Asp102 de la SEC ID N°: 1. En otras realizaciones, el epítipo comprende el resto Leu131 de la SEC ID N°: 1. Y en algunas realizaciones, el epítipo comprende además uno o más restos seleccionados de entre Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1.

Se proporciona también un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo comprende uno o más restos del dominio de Kunitz 1 y uno o más restos del dominio de Kunitz 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 6 o en la SEC ID N°: 8. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 7 o en la SEC ID N°: 9. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 6 y la cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 7.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende la cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 8 y la cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 9. En algunas realizaciones, también se contempla que el anticuerpo monoclonal aislado pueda comprender una
5 cadena ligera o una cadena pesada con homología sustancial con las que se proporcionan. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal aislado que comprender la homología sustancial puede comprender una o más sustituciones conservadoras.

En algunas realizaciones, los restos del dominio de Kunitz 1 comprenden
10 uno o más restos seleccionados de entre Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62 de la SEC ID N°: 1 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Asp31 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Asp32 de la SEC ID N°: 1. En algunas
15 realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Gly33 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Pro34 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Cys35 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto
20 Lys36 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Cys59 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Glu60 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Asn62 de la SEC ID N°: 1.

25 En algunas realizaciones, los restos del dominio de Kunitz 1 comprenden

los restos Pro34 y Glu60 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, los restos del dominio de Kunitz 1 comprenden los restos Pro34 y Lys36 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, los restos del dominio de Kunitz 1 comprenden los restos Pro34, Lys36 y Glu60 de la SEC ID N°: 1.

- 5 En algunas realizaciones, los restos del dominio de Kunitz 2 comprenden uno o más restos seleccionados de entre Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128 de la SEC ID N°: 1 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Glu100 de la
- 10 SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Glu101 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Pro103 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Gly104 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de
- 15 Kunitz 2 comprende el resto Ile105 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Cys106 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Arg107 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Gly108 de la SEC ID N°: 1.
- 20 En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Tyr109 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Phe114 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Asn116 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2
- 25 comprende el resto Glu123 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el

resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Arg124 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Lys126 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Tyr127 de la SEC ID N°: 1.

- 5 En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende los restos Arg107 y Glu101 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende los restos Arg107 y Tyr109 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende los restos Arg107, Glu101 y Tyr109 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Gly128 de la SEC ID N°: 1.

En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 puede comprender adicionalmente uno o más restos seleccionados de entre Asp102, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1 y sus combinaciones.

- 15 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado comprende un resto del dominio de Kunitz 1 que comprende uno o más restos seleccionados de entre Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62; y un resto del dominio de Kunitz 2 que comprende uno o más restos seleccionados de entre Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128.

- 25 También se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo comprende dos bucles de aminoácidos enlazados por un puente disulfuro entre los restos Cys35 y Cys59 de la SEC ID N°: 1. En algunas

realizaciones, el epítopo comprende además uno o más restos del dominio de Kunitz 1 y uno o más restos del dominio de Kunitz 2. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 1 comprende uno o más restos seleccionados de entre Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62 de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, el resto del dominio de Kunitz 2 comprende uno o más restos seleccionados de entre Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128 de la SEC ID N°: 1.

También se proporcionan anticuerpos que pueden competir con cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento por la unión del TFPI. Por ejemplo, un anticuerpo que se une al mismo epítopo que los anticuerpos descritos en el presente documento podrá competir de forma eficaz por la unión al TFPI. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al TFPI, en el que el anticuerpo monoclonal aislado es competitivo con cualquiera de los anticuerpos monoclonales aislados descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 8. En algunas realizaciones, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 9. En algunas realizaciones, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 2 y una cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 3. En algunas realizaciones, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 4 y una cadena pesada como

se muestra en la SEC ID N°: 5. En algunas realizaciones, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 6 y una cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 7. En algunas realizaciones, el anticuerpo es competitivo con un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 8 y una cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 9.

También se proporcionan anticuerpos biespecíficos que pueden competir con cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento por la unión del TFPI. Por ejemplo, tales anticuerpos biespecíficos pueden unirse a uno o más epítopos descritos anteriormente.

El anticuerpo puede ser específico de especie o puede presentar reacción cruzada con varias especies. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede reaccionar de forma específica o cruzada con el TFPI de ser humano, ratón, rata, cobaya, conejo, mono, cerdo, perro, gato o de otras especies de mamíferos.

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

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

Aunque se proporcionan secuencias de aminoácidos de los anticuerpos monoclonales, se contempla que las secuencias de ácidos nucleicos puedan diseñarse para codificar cualquiera de estos anticuerpos monoclonales. Tales polinucleótidos pueden codificar una cadena ligera o una cadena pesada del anticuerpo anti-TFPI. En algunas realizaciones, tales polinucleótidos pueden codificar tanto la cadena ligera como la cadena pesada del anticuerpo anti-TFPI

31

separadas por un enlace degradable. Además, los anticuerpos mencionados anteriormente pueden producirse usando vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los anticuerpos monoclonales y células huésped que comprenden tales vectores.

5 ***Procedimientos para preparar anticuerpos frente al TFPI***

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

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

En un ejemplo, para expresar los anticuerpos, o sus fragmentos de anticuerpo, se insertan ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa obtenidos mediante técnicas convencionales de biología molecular en vectores de expresión de manera que los genes están enlazados
25 de manera funcional a secuencias de control de la transcripción y la traducción.

En este contexto, se pretende que la expresión "enlazado de manera funcional" signifique que el gen de un anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector realizan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se escogen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, unión de sitios de restricción complementarios del fragmento génico del anticuerpo y el vector o unión de extremos romos si no existen sitios de restricción presentes). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpos insertándolas en los vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado de manera que el segmento V_H se une de manera funcional al/a los segmento(s) C_H dentro del vector y el segmento V_L se une de manera funcional al segmento C_L dentro del vector. De manera adicional o alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal se une en fase al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de

inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

Además de los genes que codifican cadenas de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se quiere transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los ejemplos de secuencias reguladoras para expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen niveles altos de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. De forma alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la β -globina.

Además de los genes de cadena de anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del

vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel y col.). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el/los vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesada y ligera se transfecta(n) en una célula huésped mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" engloben una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente en células huésped de mamíferos, es lo más preferido debido a que es más probable que dichas células eucariotas, y en particular las células de mamíferos, ensamblen y secreten un anticuerpo plegado de manera apropiada e inmunológicamente activo.

Los ejemplos de células huésped de mamíferos adecuadas para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen células de ovario de hámster

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

15 ***Uso de secuencias de anticuerpo parciales para expresar anticuerpos intactos***

De manera predominante, los anticuerpos interaccionan con antígenos objetivo a través de restos de aminoácido que se sitúan en las seis CDR de las cadenas pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias de fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico insertadas en

secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véanse, por ejemplo, Riechmann, L. y col., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. y col., 1986, Nature 321:522-525; and Queen, C. y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033). Tales secuencias estructurales pueden

5 obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpo maduras debido a que no incluirán genes variables ensamblados completamente, que se forman mediante la unión de V(D)J durante la maduración de los linfocitos B. No es

10 necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo en particular con el fin de recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). Normalmente, la parte de cadena pesada o ligera que abarca las regiones CDR es suficiente para este propósito. La secuencia

15 parcial se usa para determinar qué segmentos génicos de unión y variables de línea germinal contribuyeron a los genes variables del anticuerpo recombinante. La secuencia de línea germinal se usa después para rellenar las porciones que faltan de las regiones variables. Las secuencias líder de la cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no

20 contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Por este motivo, es necesario el uso de la secuencia líder de línea germinal correspondiente para las construcciones de expresión. Para añadir secuencias ausentes, pueden combinarse secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos por unión o amplificación por PCR. De forma alternativa, puede sintetizarse la

25 región variable entera como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes,

y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de la región variable totalmente sintético. Este procedimiento tiene determinadas ventajas tales como la eliminación o la inclusión de sitios de restricción particulares o la optimización de codones particulares.

- 5 Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y ligera sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras:
- 10 se interrumpen las series de bases de nucleótidos repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios de iniciación de la traducción óptimos de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); y se modifican por introducción de sitios de restricción de endonucleasa corriente arriba de los sitios de iniciación
- 15 de la traducción.

- Para las regiones variables de cadena tanto pesada como ligera, las secuencias codificantes optimizadas, y las no codificantes correspondientes, se dividen en secciones de 30-50 nucleótidos aproximadamente a la mitad del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por tanto, para cada cadena,
- 20 los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos de doble cadena solapantes que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Las combinaciones se usan después como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Normalmente, un conjunto de oligonucleótidos de una única región variable se dividirá en dos conjuntos que
- 25 se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes.

Estos productos solapantes se combinan después mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones de vectores de expresión.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan después con secuencias clonadas de promotor, de iniciación de la traducción, de región constante, no traducidas en 3', de poliadenilación y de terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células huésped que se fusionan después para formar una célula huésped que exprese ambas cadenas.

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

Composiciones farmacéuticas

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de anticuerpo monoclonal anti-TFPI y un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Vehículo

farmacéuticamente aceptable" es una sustancia que puede añadirse al principio activo para ayudar a formular o estabilizar la preparación y no provoca efectos toxicológicos adversos significativos al paciente. Los ejemplos de tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen agua, azúcares tales como maltosa o sacarosa, albúmina, sales tales como cloruro de sodio, etc. Otros vehículos se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal anti-TFPI. En algunas realizaciones, tales composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos monoclonales anti-TFPI. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un anticuerpo que se une específicamente al dominio de Kunitz 1 como se describe anteriormente y un anticuerpo que se une específicamente al dominio de Kunitz 1 y 2 como se describe anteriormente.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Preferentemente, la composición se formula para inyección parenteral. La composición puede formularse como una solución, una microemulsión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para concentraciones de fármaco elevadas. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de ellos. En algunos casos, incluirá en la composición agentes

isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno
5 o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según convenga, seguido de microfiltración esterilizante. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la
10 preparación de soluciones inyectables estériles, algunos procedimientos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una de sus soluciones previamente filtrada de forma estéril.

15 ***Usos farmacéuticos***

El anticuerpo monoclonal puede usarse con fines terapéuticos para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de las realizaciones descritas anteriormente pueden usarse para bloquear la interacción del TFPI con el FXa, o para evitar
20 la inhibición dependiente del TFPI de la actividad del TF/FVIIa. Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal puede usarse también para reestablecer la generación del FXa dirigida por el TF/VIIa para sortear la insuficiencia de la amplificación del FXa dependiente del FVIII o del FIX.

Los anticuerpos monoclonales tienen un uso terapéutico en el
25 tratamiento de trastornos de la hemostasis tales como la trombocitopenia, los

44

trastornos plaquetarios y los trastornos de hemorragia (por ejemplo, la hemofilia a, la hemofilia B y la hemofilia C). Tales trastornos pueden tratarse mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-TFPI a un paciente que lo necesita. Los anticuerpos monoclonales también tienen un uso terapéutico en el tratamiento de hemorragias incontroladas en indicaciones tales como el ictus traumático o hemorrágico. Por tanto, también se proporciona un procedimiento para acortar el tiempo de hemorragia que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI de la invención a un paciente que lo necesita.

Los anticuerpos pueden usarse como tratamiento único o en combinación con otros tratamientos para tratar un trastorno hemostático. Por ejemplo, se cree que la coadministración de uno o más anticuerpos de la invención con un factor de coagulación tal como el factor VIIa, el factor VIII o el factor IX es útil para tratar la hemofilia. En una realización, se proporciona un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación que comprende administrar (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une al inhibidor de la ruta del factor tisular humano y (b) una segunda cantidad del factor VIII o del factor IX, en el que dichas primera y segunda cantidades juntas son eficaces para tratar dichas deficiencias o defectos. En otra realización, se proporciona un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos en la coagulación que comprende administrar (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une al inhibidor de la ruta del factor tisular humano y (b) una segunda cantidad del factor VIII o del factor IX, en el que dichas primera y segunda

cantidades juntas son eficaces para tratar dichas deficiencias o defectos y, además, en el que no se coadministra el factor VII. La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación de un anticuerpo monoclonal de la invención y factor VIII o factor IX, en la que la composición no contiene factor VII. "Factor VII" incluye el factor VII y el factor VIIa. Es probable que estos tratamientos combinados reduzcan la frecuencia de infusión del factor de coagulación necesaria. Por coadministración o tratamiento combinado se entiende administración de dos fármacos terapéuticos formulados cada uno por separado o formulados juntos en una composición y, cuando se formulan por separado, administrados aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes, pero a lo largo del mismo periodo de tratamiento.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral a sujetos que padecen hemofilia A o B a una dosificación o frecuencia que pueden variar con la gravedad del episodio de hemorragia o, en el caso de un tratamiento profiláctico, pueden variar con la gravedad de la deficiencia de coagulación del paciente.

Las composiciones pueden administrarse a pacientes que lo necesiten como una embolada o mediante infusión continua. Por ejemplo, una administración de embolada de un anticuerpo de la invención presente como un fragmento Fab puede ser en una cantidad de desde 0,0025 hasta 100 mg/kg de peso corporal, 0,025 a 0,25 mg/kg, 0,010 a 0,10 mg/kg o 0,10-0,50 mg/kg. Para la infusión continua, un anticuerpo de la invención presente como fragmento Fab puede administrarse a de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal/minuto, 0,0125 a 1,25 mg/kg/min, 0,010 a 0,75 mg/kg/min, 0,010 a 1,0

mg/kg/min o 0,10-0,50 mg/kg/min, durante un periodo de 1-24 horas, 1-12 horas, 2-12 horas, 6-12 horas, 2-8 horas o 1-2 horas. Para la administración de un anticuerpo de la invención presente como un anticuerpo de longitud completa (con regiones constantes completas), las cantidades de dosificación pueden ser de aproximadamente 1-10 mg/kg de peso corporal, 2-8 mg/kg o 5-6 mg/kg. Normalmente, tales anticuerpos de longitud completa se administrarían por infusión prolongada durante un periodo de treinta minutos a tres horas. La frecuencia de la administración dependería de la gravedad de la afección. La frecuencia podría variar desde tres veces por semana hasta una vez cada dos o tres semanas.

Adicionalmente, las composiciones pueden administrarse a los pacientes por inyección subcutánea. Por ejemplo, puede administrarse una dosis de 10 a 100 mg de anticuerpo anti-TFPI a pacientes por inyección subcutánea semanalmente, bisemanalmente, o mensualmente.

Tal como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI o de una combinación de tal anticuerpo y factor VIII o factor IX que se necesita para incrementar efectivamente el tiempo de coagulación *in vivo* o, de otro modo, provocar un beneficio medible *in vivo* a un paciente que lo necesita. La cantidad exacta dependerá de numerosos factores, incluyendo, pero sin limitarse a, los componentes y las características físicas de la composición terapéutica, la población de pacientes a la que se destina, las consideraciones del paciente individual y similares, y puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

Ejemplos

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

Sistema de expresión

Se utilizó el vector de destino (de acuerdo con la nomenclatura Gateway), denominado pD Eco5 N. pD Eco5 N se basa en el pET-16 b (Novagen), y adicionalmente codifica una marca de His₁₀ y NusA así como un casete de clonación Gateway para expresión de la proteína de fusión que consiste en His₁₀/NusA y la proteína de interés.

Se clonó una construcción de TFPI que codifica un sitio de escisión de trombina fusionado al extremo N terminal del dominio de Kunitz 2 (Lys93 a Phe154, referencia Uniprot 10646) y los sitios de unión de Gateway (nº attB1-5, nº attB2-3, Invitrogen) en el vector pD Eco5 N dando como resultado el vector de expresión denominado pD Eco5 N TFPI KD2. Se utilizó la cepa de expresión BL21 DE3 (Novagen).

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

MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY
EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT OPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES
VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE
20 AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGQLEFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE
VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN
PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM
TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD
EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL
25 AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSLVPRGSKP

us

DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM NNFETLEECK NicedgpNGF

Componentes de secuencia

Marca de His 10:MGHHHHHHH HH

Marca de NusA: SSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY

5 EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESLNL GDYVEDQIES
VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE
AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGAQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE
VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN
PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM
10 TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD
EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL
AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEA

Engarce/sitios de restricción de endonucleasa traducidos:

TSGS GLE

15 Sitio att traducido:

TSLYKKA GS

Sitio de trombina:

LVPRGS

TFPI Kunitz 2 GSLVPRGSKP DFCFLEEDPG ICRGYITRYF YNNQTKQCER FKYGGCLGNM NNFETLEECK

20 NicedgpNGF

Expresión

Se hizo crecer una cepa de BL21 DE3 transformada con pD Eco5 N N° 209 como un precultivo en 2x 50 ml de medio LB con 200 µg/ml de ampicilina durante 14 h a 37 °C con una velocidad de agitación de 180 rpm. A 25 continuación, se inocularon ocho matraces agitadores con 400 ml de medio

Circlegrow (Q-Biogene), cada uno con 8 ml de precultivo y se incubaron a 37 °C, con una velocidad de agitación de 180 rpm. A una densidad de cultivo de DO600, se añadió IPTG (concentración final 100 mM) para inducción génica y adicionalmente se cultivó a 17 °C durante 24 h con 180 rpm. Se sedimentó *E. coli* por centrifugación (3000 g, 10 min) y se almacenó a -80 °C.

Purificación

Se resuspendió la masa de *E. coli* sedimentada a partir de 3,2 l de cultivo en 200 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, 10% (p/p) de glicerol, imidazol 40 mM, cóctel de inhibidor de proteasas Complete libre de EDTA (Roche)), homogeneizado en un dispositivo de alta presión (Microfluidics) y después se centrifugó el lisado (100.000 g, 60 min, 4 °C). Se realizaron varias etapas de purificación usando un sistema Äkta Explorer. Se aplicó la muestra concentrada en una etapa de cromatografía IMAC inicial a dos unidades de 5 ml enlazadas de matriz Hi-Trap-Sepharose HP (GE). Se realizó el equilibrado, la unión a proteína de fusión y el lavado de la matriz Hi-Trap-Sepharose HP usando el tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 40 mM). Para la elución de la proteína de fusión NusA-TFPI, se usó un gradiente lineal de imidazol de desde 40 hasta 500 mM en un tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM). Se combinaron y se concentraron las fracciones de elución (en un factor de 6-7 usando un dispositivo de ultrafiltración Amicon) y se intercambió el tampón a Tris HCl pH 8,0. A la muestra concentrada (6-7 ml) se le aplicó adicionalmente cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephacryl-100 (XK26/74) en Tris HCl pH 8,0. Se combinaron las fracciones del pico principal que contenían la proteína de fusión, se concentraron por ultrafiltración (Amicon) hasta un

volumen de 5 ml. Se añadió trombina (HTI) a la muestra (proporción enzima: proteína de fusión, 1:50 p/p), se incubó durante 5 h a 21 °C y finalmente se detuvo la reacción por PMSF (concentración final 1 mM). Posteriormente, se realizó una segunda etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (Sephacryl-100 (XK26/74) en Tris HCl pH 8.0) y se monitorizaron las fracciones de pico por PAGE. Se recogieron las fracciones que contenían el dominio de Kunitz 2 del TFPI monomérico libre y se concentraron (Amicon), proporcionando aproximadamente 4 mg de producto a partir de 3,2 l de cultivo de *E. coli*.

10 Ejemplo 2. Producción de un anticuerpo monoclonal recombinante Fab A a TFPI, expresión en *E. coli* y su purificación

Expresión

Se coexpresó el Fab A usando el vector de expresión pET28a y la cepa de *E. coli* BL21 Star DE3. Se fusionaron las regiones de cadena ligera y pesada codificadas en el vector de expresión cada una en su extremo N terminal a una secuencia señal periplásmica. La región de cadena pesada también codificó en su extremo C terminal una marca de His6 para la purificación del Fab. Se usó la cepa de *E. coli* transformada crecida en el medio de expresión durante la noche TB-Instant para la autoinducción de la expresión de proteína recombinante (Nº 71491, Novagen). En resumen, se hicieron crecer 10 ml de cultivo de *E. coli* transformado (en un tubo Falcon de 50 ml) como un precultivo en medio LB con 30 µg/ml de kanamicina durante 14 h a 37 °C agitado con 180 rpm. Posteriormente, se inocularon cuatro matraces Erlenmeyer con 500 ml de medio de expresión durante la noche de TB-Instant cada uno con 2 ml del precultivo y se incubaron durante 24 h a 30 °C a 180

rpm. Se centrifugaron los cultivos a 10.000 g a 10 °C durante 30 min y el sobrenadante que contenía el Fab se usó inmediatamente para la purificación de producto adicional o se almacenó a -20 o -80 °C.

De forma alternativa, se expresó un Fab usando el vector de expresión pET28a y la cepa de *E. coli* BL21 Star DE3 en un biorreactor de 10 l (Sartorius). Se hizo crecer un cultivo de *E. coli* transformado de 500 ml en medio LB con 30 µg/ml de kanamicina durante 17 h a 37 °C, se agitó a 165 rpm y a continuación se usó para inocular un biorreactor agitado con 10 l de medio de autoinducción. El medio de autoinducción contenía los siguientes componentes, por litro: 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 9,9 g de glicerol (87 %), 12,54 g de K₂HPO₄, 2.31 g de KH₂PO₄, 0.25 g de MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g de glucosa, 2,5 g de lactosa, 30 mg de kanamicina. Se realizó el cultivo con el biorreactor durante 24 h (a 30 °C con 350 - máx. 800 rpm) y posteriormente se cultivó el sobrenadante del cultivo retirando la biomasa por centrifugación en una centrífuga (Heraeus).

Purificación

Se purificó el Fab usando un procedimiento de cromatografía en dos etapas con un dispositivo Äkta Explorer 10s. Se aplicó un módulo de fibra hueca (umbral de corte de 10 kDa) para concentrar 1 l del sobrenadante hasta un volumen final de 100 ml y para equilibrar la composición del tampón con el tampón A (Na-fosfato 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM). En una etapa de cromatografía de IMAC inicial con un sistema Äkta Explorer, se aplicó la muestra concentrada a 5 ml de matriz de superflujo Ni-NTA (Qiagen). Se realizó el equilibrado, la unión de muestra y el lavado de la matriz Ni-NTA usando el tampón A (se realizó la unión a 21 °C, las demás etapas de

cromatografía a 4 °C). Para elución del Fab, se usó un gradiente lineal de imidazol de desde 10 hasta 250 mM en el tampón A. Se combinaron las fracciones del único pico de elución (volumen total de 60 ml) y se concentró a 10 ml por ultrafiltración y se ajustó el tampón a PBS pH 7,4 usando una
5 columna de desalación Hi-Prep26/10. Posteriormente, se incubaron 2 ml de una matriz de anticuerpo de cadena ligera anti-kappa (medio de afinidad seleccionado Kappa, 0833.10 de BAC), equilibrado con PBS, con el eluato IMAC concentrado durante 1 h a temperatura ambiente bajo agitación. Se transfirió la matriz con la muestra unida a una columna de cromatografía y se
10 lavó con PBS. Se eluyó la muestra de Fab con 2 ml de glicina pH 2,0, se neutralizó con HEPES 1 M pH 7,5 y se ajustó con tampón PBS con una columna de desalación PD10 (GE, 17-0851-01).

Cuando se expresó el Fab en *E. coli* usando un biorreactor de 10 l (Sartorius) se usó el siguiente procedimiento de purificación. Se filtró
15 secuencialmente el sobrenadante del cultivo centrifugado a través de dos módulos de filtro desechables (GE, KMP-HC-9204TT; KGF-A-0504TT) con un tamaño de poro de 5 y 0,2 µm. Se aplicó un módulo de fibra hueca (umbral de corte de 10 kDa) para concentrar el sobrenadante del cultivo aclarado hasta un volumen final de 1500 ml y para ajustar la composición del tampón al tampón
20 A. Se añadieron 25 ml de matriz de superflujo Ni-NTA (Qiagen, equilibrado en tampón A) a la muestra concentrada y se incubó durante 1,5 h a 21 °C. Se transfirió la matriz con la muestra unida a una columna de cromatografía vacía (25 x 125 mm), conectada a un dispositivo de cromatografía Äkta Explorer y se lavó con el tampón A (aprox. 250 ml). Para elución del Fab, se aplicaron dos
25 gradientes de etapa posteriores con un 5% (30 ml) y un 10 % (35 ml) del

tampón B, seguido de un gradiente de elución lineal de hasta un 100% de tampón B. Posteriormente, se trataron las fracciones de elución combinadas (72 ml) como sigue: se concentraron con un dispositivo de ultrafiltración de centrifugación (corte de 10 kDa, Amicon) hasta un volumen final de 20 ml, aplicación en tres porciones a una columna de desalación (GE HiPrep, 26/10) hasta que se ajustó el tampón a PBS pH 7,4, y concentración adicional en un dispositivo de ultrafiltración de centrifugación (Amicon) hasta un volumen final de 40 ml. Se incubó la muestra concentrada con 5 ml de matriz de anticuerpo de cadena ligera anti-kappa (medio de afinidad seleccionado Kappa, BAC, equilibrado con PBS) durante 1 h a temperatura ambiente bajo agitación. Se transfirió la matriz de Sepharose con la muestra unida a una columna de cromatografía y se trató con la siguiente secuencia de etapas de lavado, 4 veces con 15 ml de PBS; dos veces con 5 ml de tampón de lavado (Na-fosfato 100 mM pH 6,0, 100 ml de NaCl, arginina 500 mM). La etapa de elución consistió en la aplicación 3 veces de 5 ml de tampón de glicina HCl 100 mM pH 3,0. Se neutralizó inmediatamente el eluato con Tris-HCl 1 M pH 8,0 y se retiraron los precipitados formados por centrifugación (10 min, 3,200 g). Se concentró la muestra por ultrafiltración (Amicon) y se aplicó a una columna 16/60 de grado prep Superdex-75 en un sistema de cromatografía Äkta Explorer con tampón TBS. Se analizaron las fracciones de pico por PAGE y se combinaron las fracciones que representaban una cadena pesada y ligera de Fab en una proporción molar 1.1 y se concentró de nuevo por ultrafiltración (Amicon) hasta un volumen final de 1 ml. Se aislaron aproximadamente 4 mg de Fab A de 10 l de sobrenadante del cultivo de *E. coli*.

Se usó una cromatografía de exclusión por tamaño analítica (sistema

Äkta Micro, columna S75 5/150, Tris-HCl 100 mM, pH 7,5) para demostrar la formación del complejo Fab A/TFPI KD2. Por lo tanto, se analizaron por separado Fab A, TFPI KD2 y la mezcla de Fab A más TFPI KD2 (figura 1).

5 Ejemplo 3. Cristalización y determinación de estructura por rayos X del complejo TFPI-Fab A

Cristalización

Se hicieron crecer cocristales de dominio de Kunitz 2 del TFPI y del anticuerpo monoclonal Fab A a 20 °C usando el procedimiento de gota pesada. Se concentró el complejo de proteína hasta 9 mg/ml y se cristalizó mezclando 10 volúmenes iguales de solución de proteína y solución de pocillo (15% de PEG8000, Tris HCl pH 7,5) como precipitante. Los cristales aparecieron después de un día.

Recogida y procesamiento de datos

Se ultracongelaron los cristales en nitrógeno líquido en un 30% de 15 glicerol en tampón de cristalización para su crioprotección. Se recogieron los datos en línea de haz BL14.1, sincrotrón BESSY (Berlín) en un detector MAR CCD. Se indexaron e integraron los datos con XDS (W. Kabsch (2010) *Acta Cryst.* D66, 125-132) o IMOSFLM (The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography (1994) *Acta Cryst.* D50, 760-763; A.G.W. Leslie, (1992), Joint 20 CCP4 + ESF-EAMCB. Boletín en Protein Crystallography, N° 26), se prepararon para su escalado con POINTLESS (P.R. Evans, (2005) *Acta Cryst.* D62, 72-82), y se escalaron con SCALA (P.R. Evans, (2005) *Acta Cryst.* D62, 72-82). El cristal presentó difracción de hasta 2,6 Å y poseía un grupo espacial $P2_12_12_1$ con constantes celulares $a=65,7$, $b=114,7$, $c=151,9$; $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, y dos 25 complejos TFPI-Fab en la unidad asimétrica.

Determinación y refinado de la estructura

Se resolvió la coestructura del dominio de Kunitz 2 del TFPI y del anticuerpo monoclonal Fab por reemplazo molecular usando PHASER (A.J. McCoy y col. (2007) *J. Appl. Cryst.* 40, 658-674) y estructuras de rayos X publicadas del dominio de Kunitz 2 del TFPI (código PDB 1tfx) y un fragmento Fab (código PDB 3mxw) como modelos de búsqueda. Antes del reemplazo molecular, se modificó la secuencia del modelo de Fab con CHAINSAW (N. Stein, (2008) *J. Appl. Cryst.* 41, 641 - 643). Las rondas iterativas de la construcción del modelo con COOT (P. Emsley y col. (2010) *Acta Cryst.* D66:486-501) y el refinado de probabilidad máximo usando REFMAC5.5 (G.N. Murshudov y col. (1997) *Acta Cryst.* D53, 240-255) completaron el modelo. Las regiones Phe A 31 - Asn A 35, Pro B 9, Lys M 139 - Ser M 142 y Asp140 - Phe154 of KD2 mostraron una densidad de electrones débil y no se incluyeron en el modelo. El conjunto de datos y las estadísticas de refinado se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Conjunto de datos y estadísticas de refinado para el complejo

TFPI-Fab A.	
Longitud de onda	0,9184 Å
Resolución (estructura más alta)	46-2,6 (2,7-2,6) Å
Reflexiones (observada/única)	176619 / 36076
Compleción ^a	99,9% (100,0%)
I/ σ ^a	9,8 (2,5)
R _{unión} ^{a,b}	0,115 (0,70)
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parámetros de celda unidad	
a	65,7 Å
b	114,7 Å
c	151,9 Å
R _{crist} ^c	0,25
R _{libre} ^d	0,32
Factor de temperatura de Wilson	23,87 Å ²

Longitud de enlace de RMSD	0,009 Å
Ángulos de enlace de RMSD	1,4°
Átomos de proteína	7580
Moléculas de agua	108

^a Los valores entre paréntesis son para la estructura de resolución alta.
^b $R_{unión} = \sum h k l |I_{hk1} - \langle I_{hk1} \rangle| / \sum h k l \langle I_{hk1} \rangle$ donde I_{hk1} es la intensidad de reflexión $hk1$ y $\langle I_{hk1} \rangle$ es la intensidad promedio de observaciones múltiples.
^c $R_{crist} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$ donde F_{obs} y F_{calc} son las amplitudes del factor de estructura observada y calculada, respectivamente.
^d 5% de conjunto de prueba
^e RMSD, desviación de la raíz cuadrática media del conjunto de parámetros para estereoquímica ideal

Ejemplo 4. Mapeo de epítopos basado en la estructura de rayos X de un Fab A

El complejo de TFPI-Fab A (figura 2) cristalizó como dos copias del complejo por unidad asimétrica. Las cadenas principales de los compuestos se superponen con una desviación de la raíz cuadrática media (*root mean square deviation*, RMSD) de 0,7 Å con cada Fab unido al epítopo de TFPI asociado. Se analizaron los restos de TFPI en contacto con Fab A (el epítopo) y la superficie oculta respectiva con el programa CCP4 AREAIMOL (P.J. Briggs (2000) CCP4 boletín N° 38). Los restos con una superficie oculta de 5 Å² de mínimo o con una superficie oculta de más del 50 % se han considerado en contacto (tabla 2). Se analizaron los restos de Fab A en contacto con TFPI (el parátopo) y la superficie oculta respectiva con AREAIMOL. Los restos con una superficie oculta de 5 Å² de mínimo o con una superficie oculta de más del 50 % se han considerado en contacto (tabla 3).

Tabla 2: Restos de TFPI en contacto con Fab A. Las cadenas C y D corresponden al TFPI del complejo respectivo en la unidad asimétrica.

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Glu C 100	5,6	4,3
Glu C 101	41,0	41,6
Asp C 102	50,1	85,6
Pro C 103	43,9	71,6
Gly C 104	19,1	98,9
Ile C 105	125,9	100,0
Cys C106	59,1	93,0
Arg C 107	138,6	53,4
Gly C 108	1,5	4,4
Gly C 128	7,7	57,8
Gly C129	23,2	44,1
CysC130	46,2	99,5
Leu C 131	111,5	92,8
Gly C 132	24,5	48,8
Asn C 133	5,5	17,4

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Glu N 100	31,3	20,3
Glu N 101	24,5	23,7
Asp N 102	46,7	77,0
Pro N 103	62,9	90,3
Gly N 104	21,5	89,2
Ile N 105	111,7	97,5
Cys N 106	70,2	96,4
Arg N 107	134,3	53,4
Gly N 108	6,0	12,7
Tyr N 109	7,5	4,3
LysN126	11,3	7,8
Tyr N 127	0,9	8,7
Gly N 128	11,0	81,4
Gly N 129	28,3	56,8
Cys N 130	42,5	100,0
Leu N 131	125,6	84,9
Gly N 132	27,2	71,7
Asn N 133	34,1	8,2

5

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

respectivo en la unidad asimétrica.

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Tyr A 37	41,3	47,5
Tyr A 96	25,8	94,8
Asp A 97	9,5	16,2
Ser A 98	5,6	11,2
Tyr A 99	42,2	57,5
Leu A 101	6,7	51,9
Asn B 32	43,4	41,4
Ser B 33	11,7	27,8
Ala B 35	3,8	100,0
Ile B 52	4,9	100,0
Tyr B 54	44,5	98,0
Arg B 56	40,2	49,7
Ser B 57	2,9	3,3
Lys B 58	16,2	14,0
Tyr B 60	64,0	79,8
Asn B 61	0,8	0,9
Arg B 62	51,3	50,4
Trp B 102	42,6	98,3
Ser B 104	24,5	100,0
Asp B 105	25,9	36,7
Trp B 108	40,2	49,5

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Tyr L 37	42,1	59,1
Tyr L 96	25,3	96,1
Asp L 97	21,4	29,1
Ser L 98	2,7	6,7
Tyr L 99	48,4	68,0
Leu L 101	12,4	81,0
Asn M 32	34,5	39,0
Ser M 33	6,1	17,8
Ala M 35	7,2	90,0
Ile M 52	5,4	100,0
Tyr M 54	57,0	88,3
Arg M 56	115,2	72,4
Ser M 57	4,6	4,3
Lys M 58	27,3	20,0
Tyr M 60	67,0	72,9
Asn M 61	0,8	0,9
Arg M 62	59,2	53,0
Trp M 102	33,5	100,0
Ser M 104	28,0	80,9
Asp M 105	42,5	50,0
Lys M 106	3,3	2,5
Trp M 108	75,8	53,1

El epítipo no lineal reconocido por el Fab A se define por las regiones Glu100 - Arg109 y Lys126, Gly128 - Asn133. El parátipo en el Fab A incluye los restos de cadena ligera (lc) lc_Tyr37, lc_Tyr96, lc_Asp97, lc_Ser98, lc_Tyr99, y lc_Leu101 y restos de cadena pesada (hc) hc_Asn32, hc_Ser33, 5 hc_Ala35, hc_Ile52, hc_Tyr54, hc_Arg56, hc_Lys58, hc_Tyr60, hc_Arg62, hc_Trp102, hc_Ser104, hc_Asp105 y hc_Trp108. Parece que CDR-L3, CDR-H2 y CDR-H3 son los principales sitios de interacción, basándose en el número de contactos.

El epítipo consiste en dos bucles enlazados por un puente disulfuro 10 entre Cys106 y Cys130 (figura 3). El puente disulfuro se coloca frente a hc_Trp108 of CDR-H3, mientras que Ile105 y Leu131 adyacentes se ocultan en una hendidura hidrófoba creada por hc_Ala35, hc_Ile52, hc_Tyr54 (CDR-H2), hc_Trp102 (CDR-H3) y lc_Tyr96, lc_Ser98, lc_Tyr99, lc_Leu101 (CDR-L3). Basándose en el número de contactos, Ile105 y Leu131 son restos de epítopos 15 clave en el contacto hidrófobo con CDR-L3, CDR-H2 y CDR-H3.

La región de TFPI Glu101 - Ile105 interacciona con CDR-H2. La interfase se caracteriza fuertemente por hc_Tyr54, hc_Tyr60 y hc_Arg62. Hc_Tyr54 muestra interacciones polares con la cadena lateral de Asp102. Hc_Tyr60 muestra interacciones polares con el oxígeno del carbonilo de la 20 cadena principal de Glu101 y hc_Arg62 con la cadena lateral de Asp102 y el oxígeno del carbonilo de la cadena principal de Gly132.

Asp102 es un resto de epítipo clave en la interacción polar con CDR-H2 hc_Tyr54 y hc_Arg62. El reemplazo de hc_Asp62 natural con arginina en Fab A da como resultado un incremento en la afinidad de 120 veces. Basándose en la 25 estructura de rayos X, esto se puede explicar por el cambio de la repulsión

entre hc_Asp62 y Asp102 a la interacción polar de hc_Arg62 y Asp102, y los oxígenos del carbonilo de la cadena principal.

El grupo guanidinio de Arg107 interacciona directamente con las cadenas laterales de hc_Asn32 y hc_Asp105 de CDR-H1 y CDR-H3, respectivamente. Se ha demostrado que Arg107 es esencial para la inhibición del factor Xa (M.S. Bajaj y col. (2001) *Thromb Haemost* 86(4):959-72.). Fab A ocupa este resto crítico y compite con la función Arg107 en la inhibición del factor Xa.

Ejemplo 5. Comparación de parátomos de Fab A y su variante optimizada Fab C

Para evaluar la consistencia de la unión al epítipo del TFPI por la variante optimizada de Fab A, Fab C, se analizaron alineamientos de secuencias de las cadenas ligera y pesada (figura 11A) y modelos de homología de Fab C (figura 11B) para determinar la conservación de restos de parátomos de Fab A en Fab C. Se calcularon los modelos de homología con DS MODELER (ACCELRYS, Inc; Fiser, A. y Sali A. (2003) *Methods in Enzymology*, 374:463-493) usando la estructura de rayos X de TFPI - Fab A de la invención como estructura de plantilla de entrada. Los modelos de homología muestran conformaciones de esqueleto casi idénticas en comparación con Fab A con RMSD < 0,5 Å. De 20 restos de parátomos observados en el complejo TFPI-Fab A, hc_Asn32 es el único resto de parátomo que difiere en Fab C, en el que un resto aspartato se encuentra en la posición respectiva (figura 11). Hc_Asn32 interacciona con Arg107 de TFPI. Asp32 de Fab C debería interaccionar más estrechamente con TFPI dado su grupo carboxilato e interacción prospectiva con el grupo guanidinio de Arg107. Basándose en la conservación de

secuencia alta entre los restos de parátomos de Fab A y Fab C y la conformación de esqueleto idéntica esperada, Fab C reconoce probablemente el mismo epítipo del TFPI que Fab A.

Ejemplo 6. Razones basadas en la estructura de rayos X para la
5 **inhibición de la interacción de TFPI-factor Xa**

Fab A anticipa la interacción y la inhibición de TFPI-factor Xa. La superposición del complejo TFPI-Fab A con la estructura de TFPI-tripsina (M.J. Burgering y col (1997) J Mol Biol. 269(3):395-407) muestra que la región de TFPI que contiene el epítipo de Fab A es crucial para la interacción con
10 tripsina, que es un sustituto para el factor Xa. Basándose en la estructura de rayos X, la unión del Fab A con el epítipo observado en el dominio de Kunitz 2 debe excluir la unión del factor Xa por impedimento estérico (figura 4).

Ejemplo 7. Producción de un TFPI recombinante (dominio de Kunitz 1 +
2), **expresión en *E. coli* y su purificación**

15 ***Sistema de expresión***

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

Se clonó una construcción de ADN que codifica un sitio de escisión de proteasa TEV fusionado al extremo N terminal de los dominios de Kunitz 1 + 2 (Asp1 a Phe154, referencia Uniprot 10646, TFPI alfa maduro) y los sitios de unión de Gateway (nº attB1-5, nº attB2-3, Invitrogen) en el vector pD Eco5 N
25 dando como resultado el vector de expresión denominado pD Eco5 N TFPI

KD1+2. La cepa de expresión usada fue BL21 DE3 (Novagen).

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

SECUENCIA 699 AA; 78579 PM; 4D2932FF7C1E3F7E CRC64;

5 MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HMNKEILAVV EAVSNEKALP REKIFEALES ALATATKKKY

EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESINL GDYVEDQIES

VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE

AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGAQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE

VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN

10 PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM

TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD

EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL

AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDEATSGS GLETSLYKKA GSDYDIPTTE

NLYFQDSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC KAIMKRFFFN IFTRQCEEFI

15 YGGCEGNQNR FESLEECKKM CTRDNANRII KTTLQQEKP DFCFLEEDPGI CRGYITRYFY

NQQTQQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

Componentes de secuencia

Marca de His 10: MGHHHHHHHH HH

20

Marca de NusA:	SSGHIEGR	HMNKEILAVV	EAVSNEKALP
----------------	----------	------------	------------

REKIFEALES ALATATKKKY

EQEIDVRVQI DRKSGDFDTF RRWLVVDEVT QPTKEITLEA ARYEDESINL GDYVEDQIES

VTFDRITTQT AKQVIVQKVR EAERAMVVDQ FREHEGEIIT GVVKKVNRDN ISLDLGNNAE

AVILREDMLP RENFRPGDRV RGVLYSVRPE ARGAQLFVTR SKPEMLIELF RIEVPEIGEE

25 VIEIKAAARD PGSRAKIAVK TNDKRIDPVG ACVGMRGARV QAVSTELGGE RIDIVLWDDN

PAQFVINAMA PADVASIVVD EDKHTMDIAV EAGNLAQAIG RNGQNVRLAS QLSGWELNVM
TVDDLQAKHQ AEAHAAIDTF TKYLDIDEDF ATVLVEEGFS TLEELAYVPM KELLEIEGLD
EPTVEALRER AKNALATIAQ AQEESLGDNK PADDLLNLEG VDRDLAFKLA ARGVCTLEDL
AEQGIDDLAD IEGLTDEKAG ALIMAARNIC WFGDE

5

Engarce/sitios de restricción de endonucleasa traducidos: TSGS

GLE

Sitio att traducido: TSLYKKA GS

10

Sitio TEV: DYDIPTTENLYFQ

TFPI Kunitz 1+2 DSEED EEHTIITDTE LPPLKLMHSF CAFKADDGPC

KAIMKRFFFN IFTRQCEEFI

YGGCEGNQNR FESLEECKKM CTRDNANRII KTTLQQEKPD FCFLEEDPGI CRGYITRYFY

15

NQQTQQCERF KYGGCLGNMN NFETLEECKN ICEDGPNGF

Expresión

Se hizo crecer una cepa de BL21 DE3 transformada con pD Eco5 N
TFPI KD1+2 como un precultivo en 2x 100 ml de medio LB con 200 µg/ml de
ampicilina durante 14 h a 37 °C con agitación de 180 rpm. Se inoculó un
20 biorreactor (Sartorius Stedim Biotech) con un volumen de cultivo de 10 l (medio
LB, 200 µg/ml de ampicilina) con 200 ml de precultivo y se incubó a 37 °C, con
agitación de 150 rpm. A una densidad de cultivo de DO600, se añadió IPTG
hasta una concentración final de 100 mM para la inducción génica y se cultivó
adicionalmente a 17 °C durante 24 h con un nivel mínimo del 50 % y una
25 velocidad de agitación de 180 – 800 rpm. Se sedimentó *E. coli* por

centrifugación (3000 g, 10 min) y se almacenó a -80 °C.

Purificación

Se resuspendió la masa de *E. coli* sedimentada a partir de 10 l de cultivo en 500 ml de tampón de lisis [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, 10% (p/p) de glicerol, imidazol 40 mM, cóctel de inhibidor de proteasas Complete libre de EDTA (Roche)], homogeneizado en un dispositivo de alta presión (Microfluidics) y después se centrifugó el lisado (100.000 g, 60 min, 4 °C). Se realizaron varias etapas de purificación usando un sistema de purificación Äkta. Se aplicó la fracción de lisado soluble centrifugada en una etapa de cromatografía IMAC inicial a una columna que contenía 50 ml de matriz Ni-Sepharose HP (GE). Se realizó el equilibrado, la unión a proteína de fusión y el lavado de la matriz Hi-Trap-Sepharose HP usando el tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 40 mM). Para la elución de la proteína de fusión NusA-TFPI, se usó un gradiente lineal de imidazol de desde 40 hasta 500 mM en un tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM). Se combinaron las fracciones de elución (volumen total de 140 ml) y se aplicaron en fracciones a una columna de desalado Hi Prep 26/10 (GE) (dos unidades de columna enlazadas) para el intercambio a un tampón con Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). Para retirar la marca de Nus A, se realizó una digestión proteolítica con TEV marcado con His₆, con una proporción de enzima con respecto a proteína de fusión de 1:66 p/p, durante 16 h a 4 °C. Se aplicó de nuevo la muestra a una columna que contenía 50 ml de matriz Ni-Sepharose HP (GE) para separar el TFPI libre de la proteína de fusión no escindida y de His-TEV. Después, se aplicó el eluato de la etapa de IMAC a cromatografía de exclusión por tamaño, SEC (S100, GE) para aislar una

fracción de TFPI monomérica que se concentró por ultrafiltración (Amicon, unidad con intervalo de corte de 3 kDa) hasta aproximadamente 1,5 mg/ml. La muestra de dominio de Kunitz 1 + 2 del TFPI final purificada funcionó como una banda doble en PAGE con un peso molecular aparente de aproximadamente 18 kDa. Un análisis adicional (SEC, transferencia Western) reveló que sólo la

Ejemplo 8. Procesado proteolítico y purificación de Fab B a partir de IgG1 humana.

Expresión

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

Se usó papaína inmovilizada (Pierce, 20 ml de suspensión) para digerir aproximadamente 270 mg (en 12,5 ml) de IgG1 usando 22 fracciones en tubos de reacción Eppendorf de 1,5 ml (incubación 16 h, 37 °C, agitación 1400 rpm). Después del procesado, se centrifugaron las muestras, se recogió el sobrenadante, se lavó el sedimento con PBS y se combinaron los sobrenadantes y el lavado aclarado.

Se aplicó de nuevo la muestra digerida a dos columnas HiTrap

MabSelectSuRe enlazadas (2 x 5 ml) permitiendo una separación de Fc y Fab. Se concentraron las fracciones de Fab B aisladas combinadas por ultrafiltración hasta aproximadamente 8 mg/ml (rendimiento total de 120 mg). Adicionalmente, se usó cromatografía de exclusión por tamaño con
5 Superdex75 (columna 26/60, caudal 2,5 ml/min con PBS) para purificación adicional. Después de concentración y filtración estéril adicionales, el rendimiento final del Fab B fue de 115 mg a una concentración de 8,5 mg/ml.

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

Ejemplo 9. Producción del complejo dominio de Kunitz 1 + 2 del TFPI 15 con Fab B

Para formar el complejo inmunitario, se combinaron el dominio de Kunitz 1 + 2 del TFPI y Fab B en una proporción de aproximadamente 1:1,5 (p/p). Por lo tanto, se mezclaron 3,85 mg de la proteína de dominio de Kunitz 1 + 2 del TFPI monomérica concentrada (a partir de fracciones combinadas S100) con
20 7,4 mg de Fab B (a partir de SEC Superdex75) y se incubó durante 16 h a 21 °C. Se demostró la formación del complejo por medio de SEC (S200/150) analítico y transferencia de Western. Se purificó adicionalmente el complejo SEC (S200 26/26) en Tris-HCl 10 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM, se concentró por ultrafiltración (Amicon, unidad con intervalo de corte de 5 kDa) hasta 10,3
25 mg/ml, que se usó para cristalización.

Ejemplo 10. Cristalización y determinación de estructura por rayos X del complejo TFPI-Fab B

Cristalización

Se hicieron crecer cocristales de una construcción de proteína que
5 comprendía dominio de Kunitz 1 (KD1) y dominio de Kunitz 2 (KD2) del TFPI y
el anticuerpo de TFPI monoclonal Fab B a 4 °C usando el procedimiento de
gota pesada. Se concentró el complejo de proteína hasta 10 mg/ml y se
cristalizó mezclando volúmenes iguales de solución de proteína y solución de
pocillo (20% de PEG8000) como precipitante. Los cristales aparecieron
10 después de tres días.

Recogida y procesamiento de datos

Se ultracongelaron los cristales en nitrógeno líquido en un 30% de
glicerol en tampón de cristalización para su crioprotección. Se recogieron los
datos de un cristal en línea de haz BL14.1, sincrotrón BESSY (Berlín) en un
15 detector MAR CCD. Se indexaron y se integraron los datos con IMOSFLM
(A.G.W. Leslie, (1992), Joint CCP4 + ESF-EAMCB. Boletín en Protein
Crystallography, N° 26), se prepararon para su escalado con POINTLESS (P.R.
Evans, (2005) Acta Cryst. D62, 72-82), y se escalaron con SCALA (P.R. Evans,
(2005) Acta Cryst. D62, 72-82). El cristal presentó difracción de hasta 2,3 Å y
20 poseía un grupo espacial $P2_1$ con constantes celulares $a=80,3$, $b=71,9$,
 $c=108,8$; $\beta=92,5^\circ$, y dos complejos TFPIKD1, -KD2 - Fab en la unidad
asimétrica.

Determinación y refinado de la estructura

Se resolvió la coestructura de TFPI-KD1, -KD2 y el anticuerpo
25 monoclonal Fab por reemplazo molecular usando PHASER (A.J. McCoy y col

(2007) *J. Appl. Cryst.* 40, 658-674), MOLREP (A. Vagin y A. Teplyakov (1997) *J. Appl. Cryst.* 30, 1022-10) y estructuras de rayos X internas y publicadas de TFPI-KD2 (código PDB 1tfx) y un fragmento Fab (código PDB 1w72) como modelos de búsqueda. Antes del reemplazo molecular, se procesaron los

5 modelos de Fab y KD1 con CHAINSAW (N. Stein, (2008) *J. Appl. Cryst.* 41, 641 - 643). Las rondas iterativas de la construcción del modelo con COOT (P. Emsley y col. (2010) *Acta Cryst.* D66:486-501) y el refinado de probabilidad máximo usando REFMAC5.5 (G.N. Murshudov y col. (1997) *Acta Cryst.* D53, 240-255) completaron el modelo. La región hc_Ser131 - hc_Ser136 tanto de

10 Fab, restos de TFPI Asp1 - Leu21, Asp149 - Phe154, como de los restos enlazadores de KD1 - KD2 Arg78 - Glu92 mostró una densidad de electrones débil y no se incluyó en el modelo. El conjunto de datos y las estadísticas de refinado se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Conjunto de datos y estadísticas de refinado para el complejo TFPI-

15 Fab B.

Longitud de onda	0,9184 Å
Resolución (estructura más alta)	47-2,3 (2,4-2,3) Å
Reflexiones (observada/única)	165457 (56223)
Compleción ^a	97,8% (97,8%)
I/ σ ^a	5,8 (2,0)
R _{unión} ^{a,b}	0,13 (0,52)
Grupo espacial	P2 ₁
Parámetros de celda unidad	
a	80,3 Å
b	71,9 Å
c	108,8 Å
β	92,5°
R _{crist} ^c	0,20
R _{libre} ^d	0,27
Factor de temperatura de Wilson	16,7 Å ²
Longitud de enlace de RMSD	0,008 Å
Ángulos de enlace de RMSD	1,3°
Átomos de proteína	8205

Moléculas de agua	599
^a Los valores entre paréntesis son para la estructura de resolución alta.	
^b $R_{unión} = \sum h k l I_{h k l} - \langle I_{h k l} \rangle / \sum h k l \langle I_{h k l} \rangle$ donde $I_{h k l}$ es la intensidad de reflexión $h k l$ y $\langle I_{h k l} \rangle$ es la intensidad promedio de observaciones múltiples.	
^c $R_{crist} = \sum F_{obs} - F_{calc} / \sum F_{obs}$ donde F_{obs} y F_{calc} son las amplitudes del factor de estructura observada y calculada, respectivamente.	
^d 5% de conjunto de prueba	
^e RMSD, desviación de la raíz cuadrática media del conjunto de parámetros para estereoquímica ideal	

Ejemplo 11. Mapeo de epítomos basado en la estructura de rayos X

El complejo de TFPI-KD1, -KD2 y Fab B (figura 6) cristalizó como dos copias del complejo por unidad asimétrica. Las cadenas principales de los complejos se superponen con una RMSD total de 1,0 Å con cada Fab B unido a epítopo del TFPI-KD1 y -KD2 asociado. Ambos dominios de Kunitz interaccionan directamente o a través de interacciones mediadas por agua con Fab B. KD1 y KD2 también interaccionan entre sí. Se analizaron los restos de TFPI en contacto con Fab B (el epítopo) y la superficie oculta respectiva con el programa CCP4 AREAIMOL (P.J. Briggs (2000) CCP4 boletín N° 38). Los restos con una superficie oculta de 5 Å² de mínimo o con una superficie oculta de más del 50 % se han considerado en contacto (Tabla 5). Se analizaron los restos de Fab B en contacto con TFPI (el parátopo) y la superficie oculta respectiva con AREAIMOL. Los restos con una superficie oculta de 5 Å² de mínimo o con una superficie oculta de más del 50 % se han considerado en contacto (tabla 6).

Tabla 5: Restos de TFPI en contacto con Fab B. Las cadenas C, D y las cadenas N, O corresponden al dominio de Kunitz 1 y dominio de Kunitz 2 del TFPI del complejo respectivo en la unidad asimétrica.

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Phe C 28	3,4	4,1
Asp C 31	26,2	47,3
Asp C 32	6,8	73,9
Gly C 33	7,6	100,0
Pro C 34	87,2	97,2
Cys C 35	45,7	93,4
Lys C 36	139,6	72,4
Ala C 37	0,9	2,2
Ile C 38	3,0	2,1
Cys C 59	11,3	34,7
Glu C 60	83,9	60,4
Gly C 61	0,5	1,4
Asn C 62	4,1	11,2

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Glu D 100	83,2	53,9
Glu D 101	80,8	93,4
Pro D 103	57,4	85,7
Gly D 104	16,6	68,3
Ile D 105	11,4	61,2
Cys D 106	12,5	32,2
Arg D 107	116,8	73,2
Gly D 108	18,6	49,4
Tyr D 109	133,5	74,6
Phe D 114	8,5	72,0
Asn D 116	8,3	24,5
Glu D 123	45,5	56,5
Arg D 124	9,9	6,0
Phe D 125	0,1	0,9
Lys D126	29,2	39,0
Tyr D 127	1,3	7,1
Gly D 128	6,5	67,0

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Lys N 29	1,1	1,2
Asp N 31	28,9	49,4
Asp N 32	10,2	91,8
Gly N 33	12,5	100,0
Pro N 34	87,9	97,2
Cys N 35	42,1	86,0
Lys N 36	142,5	74,2
Ile N 38	4,3	3,2
Cys N 59	11,9	38,5
Glu N 60	71,7	53,0
Gly N 61	0,4	1,0
Asn N 62	7,0	20,2

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Glu O 100	65,1	44,3
Glu O 101	84,8	97,0
Pro O 103	60,2	84,0
Gly O 104	13,6	64,7
Ile O 105	11,6	67,4
Cys O 106	12,7	37,0
Arg O 107	101,3	69,1
Gly O 108	19,7	52,5
Tyr O 109	139,6	76,4
Thr O 111	0,1	0,1
Phe O 114	11,5	78,2
Asn O 116	13,4	34,6
Glu O 123	24,1	35,9
Arg O 124	11,1	6,7
Phe O 125	0,1	1,2
Lys O 126	35,0	52,6
Tyr O 127	1,2	8,1
Gly O 128	6,4	58,1

Tabla 6: Restos de Fab B en contacto con TFPI. Las cadenas A, B y las cadenas L, M representan las cadenas ligera y pesada de Fab B del complejo respectivo en la unidad asimétrica.

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Leu A 27	1,8	39,1
Arg A 28	20,7	13,5
Asn A 29	44,6	38,6
Tyr A 30	56,0	57,7
Tyr A 31	96,9	76,7
Tyr A 48	43,0	75,8
Tyr A 49	39,2	90,7
Asp A 50	16,5	56,7
Asn A 52	10,3	16,8
Pro A 54	10,4	34,2
Ser A 55	5,0	3,9
Asn A 65	6,3	13,4
Trp A 90	19,2	45,9
Asp A 92	13,6	10,2
Gly A 93	8,7	37,8
Gln B 1	12,6	6,8
Gly B 26	29,6	58,6
Phe B 27	21,1	57,9
Thr B 28	56,9	65,0
Arg B 30	32,0	19,2
Ser B 31	52,2	65,9

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Tyr B 32	54,0	94,9
Arg B 52	8,0	6,2
Arg B 98	7,0	49,2
Tyr B 100	92,2	98,6
Arg B 101	106,6	71,6
Tyr B 102	80,2	79,4
Trp B 103	21,7	87,7
Asp B 105	15,3	42,6
Tyr B 106	13,7	15,2

Nº de resto	superficie oculta en A ²	superficie oculta en %
Leu L 27	4,2	61,7
Arg L 28	22,2	15,5
Asn L 29	43,0	33,6
Tyr L 30	58,2	67,3
Tyr L 31	103,4	80,3
Tyr L 48	48,7	83,8
Tyr L 49	37,5	88,8
Asp L 50	15,5	59,1
Asn L 52	8,6	14,8
Pro L 54	12,9	45,4
Ser L 55	9,8	8,0
Asn L 65	3,9	7,7
Gly L 67	0,1	0,3
Trp L 90	20,3	48,3
Asp L 92	1,9	1,5
Gly L 93	18,4	49,4
Val M 2	1,6	4,3
Gly M 26	34,2	62,2
Phe M 27	18,2	62,1
Thr M 28	64,4	69,7
Arg M 30	27,1	18,8
Ser M 31	51,5	63,7
Tyr M 32	55,3	95,3
Arg M 52	7,4	6,2
Arg M 98	8,5	57,0
Tyr M 100	86,9	98,3
Arg M 101	110,8	74,4
Tyr M 102	82,8	81,0
Trp M 103	18,5	91,1
Asp M 105	17,3	48,7
Tyr M 106	13,5	15,0

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

El epítipo no lineal en TFPI-KD1 consiste en dos regiones de bucle enlazadas por un puente disulfuro entre Cys35 y Cys59. El epítipo se caracteriza por una interacción hidrófoba central de Pro34 rodeada por un triángulo de interacciones polares de Asp31, Asp32, Glu60 y Lys36 con Fab B (figura 7).

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

La interacción de Asp31 y Asp32 con CDR-H3 es una característica de epítipo clave y las orientaciones e interacciones de hc_Tyr102 y hc_Arg101 parecen cruciales. La mutación del resto natural hc_Lys99 a leucina dio como resultado un incremento en la afinidad de 20 veces. Hc_Leu99 está situado en la interfase hidrófoba entre la cadena ligera y pesada y seguido del bucle CDR-H3. Una cadena lateral de lisina polar y flexible es una desventaja en esta posición e interfiere con la conformación de CDR-H3 óptima y las interacciones con antígeno.

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

La tercera esquina del triángulo está formada por Lys36. Lys36 es un resto esencial para la inhibición del complejo factor VIIa/factor tisular por TFPI (M.S. Bajaj y col. (2001) Thromb Haemost 86(4):959-72.). En el complejo con Fab B, Lys36 está en contacto significativo y ocultado por CDR-L1 lc_Leu27, lc_Arg28, lc_Asn29, lc_Tyr31, CDR-L2 lc_Asp50 y una molécula de agua. La interacción de Lys36 con el complejo factor VIIa/factor tisular mientras está unido a Fab B y su inhibición aparecen excluidas.

El epítipo no lineal en TFPI-KD2 consiste en tres secciones que comprenden restos Glu100, Glu101, Pro103 - Tyr109, Phe114; Asn116 y Glu123; Arg124, Lys126 - Gly128. El epítipo de KD2 forma interacciones polares e hidrófobas con Fab B CDR-L1, -L2, -H1 y -H3 (figura 8).

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

con Glu100 y Glu101) CDR-L1, -L2, -H3 (interacción con Arg107), y CDR-L2, -H3 (interacción con Tyr109).

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

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

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

Ejemplo 12. Comparación de parátomos de Fab B y su variante optimizada

15 Fab D

Para evaluar la consistencia de la unión al epítipo del TFPI por la variante optimizada de Fab B, Fab D, se analizaron alineamientos de secuencias de las cadenas ligera y pesada (figura 12A) y modelos de homología de Fab D (figura 12B) para determinar la conservación de restos de
20 parátomos de Fab B en Fab D. Se calcularon los modelos de homología con DS MODELER (ACCELRY, Inc; Fiser, A. y Sali A. (2003) *Methods in Enzymology*, 374:463-493) usando la estructura de rayos X de TFPI - Fab B de la invención como estructura de plantilla de entrada. Los modelos de homología muestran conformaciones de esqueleto casi idénticas en comparación con Fab B con
25 RMSD < 0,5 Å. De 29 restos de parátomos observados en el complejo TFPI-

Fab B, siete restos (cinco restos de cadena ligera, dos restos de cadena pesada) difieren en Fab D (figura 12). Lc_Arg28; lc_Asn29, lc_Asp92, y lc_Gly93 muestran interacciones de cadena principal con los restos de epítipo de TFPI. No se espera que los intercambios de estos restos en Fab D reduzcan la unión con un epítipo de TFPI diferente. El reemplazo de lc_Tyr48 y hc_Gln1 por una fenilalanina y glutamato en Fab D es insignificante ya que no se observan interacciones de cadena lateral polares en la estructura de rayos X. Hc_Arg30 muestra una interacción polar con Glu100 de TFPI y se intercambia a una serina en Fab D. En esta posición, una arginina debe ser favorable sobre una serina para interaccionar con TFPI. Basándose en el impacto esperado de los intercambios analizados entre los restos de parátomos de Fab B y Fab D, la conservación de la secuencia total y la RMSD baja del modelo de homología de D, se contempla que Fab D reconoce el mismo epítipo de TFPI que Fab B.

Ejemplo 13 Razones basadas en la estructura de rayos X para la inhibición de la interacción TFPI con el factor Xa y el complejo de factor VIIa/factor tisular

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

y factor Xa, respectivamente (figura 9, figura 10).

Aunque se ha descrito la presente invención con referencia a las realizaciones y ejemplos específicos, debe entenderse que se pueden realizar diversas modificaciones y cambios y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del espíritu y alcance verdaderos de la invención. Por consiguiente, la memoria descriptiva y los ejemplos deben considerarse en un sentido ilustrativo en lugar de restrictivo. Además, todos los artículos, libros, solicitudes de patente y patentes mencionados en el presente documento, se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítopo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítopo
5 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en el que dicho epítopo comprende el resto Ile105 de SEC ID N°: 1.
3. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en el que dicho epítopo comprende el resto Ile105 y Asp102 de SEC ID N°: 1.
- 15 4. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en el que dicho epítopo comprende el resto Ile105, Asp102 y Leu131 de SEC ID N°: 1.
5. El anticuerpo monoclonal aislado de las reivindicaciones 2-4, en el que el
20 epítopo comprende además uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1.
- 25 6. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítopo del inhibidor de

la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo comprende dos bucles de aminoácidos enlazados por un puente disulfuro entre los restos Cys106 y Cys130 de SEC ID N°: 1.

- 5 7. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 6, en el que dicho epítipo comprende además uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1.
- 10 8. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 7, en el que dicho epítipo comprende el resto Ile105 de SEC ID N°: 1.
- 15 9. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 7, en el que el epítipo comprende el resto Asp102 de SEC ID N°: 1.
- 20 10. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 7, en el que el epítipo comprende el resto Leu131 de SEC ID N°: 1.
- 25 11. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 8-10, en el que el epítipo comprende además uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Asp102, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Lys126, Gly128, Gly129, Cys130, Leu131, Gly132 y Asn133 de la SEC ID N°: 1.

12. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo comprende uno o más restos de dominio de Kunitz 1 y uno o más restos de dominio de Kunitz 2.

5

13. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 12, en el que el resto del dominio de Kunitz 1 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62.

10

14. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 13, en el que el resto del dominio de Kunitz 1 comprende el resto Pro34.

15. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 13, en el que los restos del dominio de Kunitz 1 comprenden los restos Pro34 y Glu60.

16. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 13, en el que los restos del dominio de Kunitz 1 comprenden los restos Pro34, Lys36 y Glu60.

17. El anticuerpo monoclonal aislado de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que los restos del dominio de Kunitz 1 comprenden uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Asp31, Asp32, Gly33, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62.

18. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 12, en el que el resto

del dominio de Kunitz 2 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128.

- 5 19. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 18, en el que el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Arg107.

- 20. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 18, en el que el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Glu101.

- 10 21. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 18, en el que el resto del dominio de Kunitz 2 comprende el resto Tyr109.

- 22. El anticuerpo monoclonal aislado de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en el que los restos del dominio de Kunitz 2 comprenden además uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128.

- 20 23. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 12, en el que el resto del dominio de Kunitz 1 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y Asn62; y en el que el resto del dominio de Kunitz 2 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123,
- 25

Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128.

24. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID N°: 1), en el que dicho epítipo
5 comprende dos bucles de aminoácidos enlazados por un puente disulfuro entre los restos Cys35 y Cys59 de SEC ID N°: 1.

25. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 24, en el que dicho epítipo comprende además uno o más restos del dominio de Kunitz 1 y uno o
10 más restos del dominio de Kunitz 2.

26. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 25, en el que el resto del dominio de Kunitz 1 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y
15 Asn62.

27. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 25, en el que el resto del dominio de Kunitz 2 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107,
20 Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128.

28. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 22, en el que el resto del dominio de Kunitz 1 comprende uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en Asp31, Asp32, Gly33, Pro34, Cys35, Lys36, Cys59, Glu60 y
25 Asn62; y en el que el resto del dominio de Kunitz 2 comprende uno o más

restos seleccionados del grupo que consiste en Glu100, Glu101, Pro103, Gly104, Ile105, Cys106, Arg107, Gly108, Tyr109, Phe114, Asn116, Glu123, Arg124, Lys126, Tyr127 y Gly128.

5 29. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a TFPI, en el que el anticuerpo monoclonal aislado es competitivo con cualquiera de los anticuerpos monoclonales aislados de las reivindicaciones 1 a 28 para la unión a TFPI.

30. Un anticuerpo biespecífico aislado que se une a TFPI, en el que el
10 anticuerpo biespecífico es competitivo con cualquiera de los anticuerpos monoclonales aislados de las reivindicaciones 1 a 28 para la unión a TFPI.

31. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal de cualquiera de las
15 reivindicaciones 1-30, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

32. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos dos anticuerpos monoclonales de cualquiera de las reivindicaciones 1-30, y un vehículo farmacéuticamente
20 aceptable.

33. La composición farmacéutica de la reivindicación 32, en la que el primer anticuerpo monoclonal comprende el anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, y un segundo anticuerpo monoclonal comprende el anticuerpo
25 monoclonal aislado de la reivindicación 12.

34. Un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos o adquiridos en la coagulación que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 30-32 a un paciente.

5

35. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que el procedimiento trata hemofilia A, B o C.

36. Un procedimiento para acortar el tiempo de hemorragia que comprende
10 administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 31-33 a un paciente.

37. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que se une a un epítipo del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (SEC ID. N°:
15 1) que codifica dicho anticuerpo monoclonal aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-29.

RESUMEN

Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados que se unen a epítopos específicos del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (TFPI) y
5 las moléculas de ácido nucleico aisladas que los codifican. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti-TFPI y procedimientos de tratamiento de deficiencias o defectos en la coagulación por la administración de los anticuerpos.

Figura 1

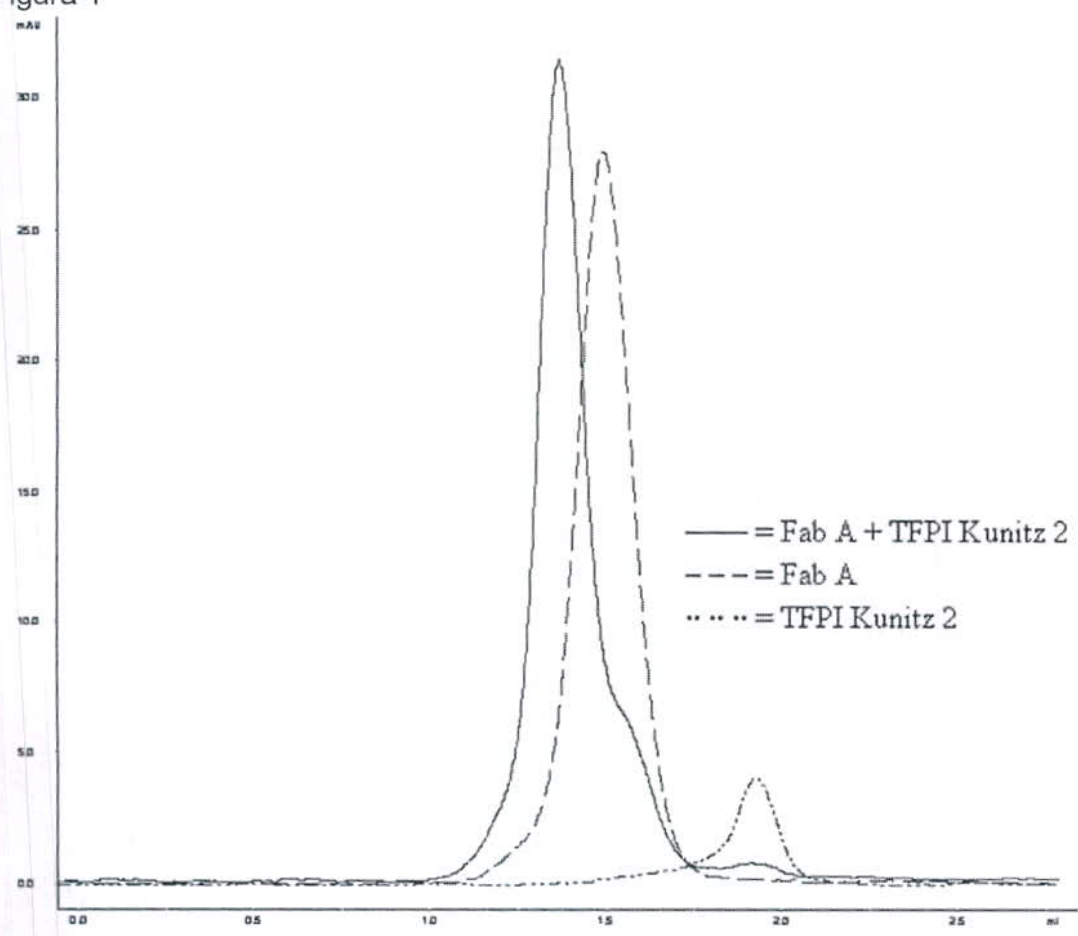


Figura 2

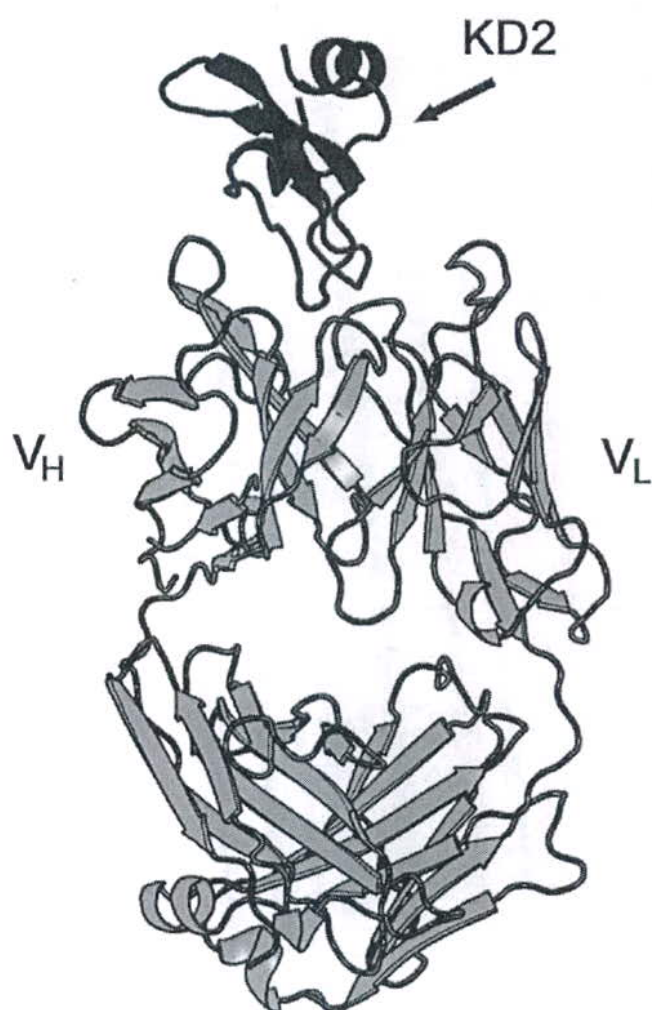


Figura 3

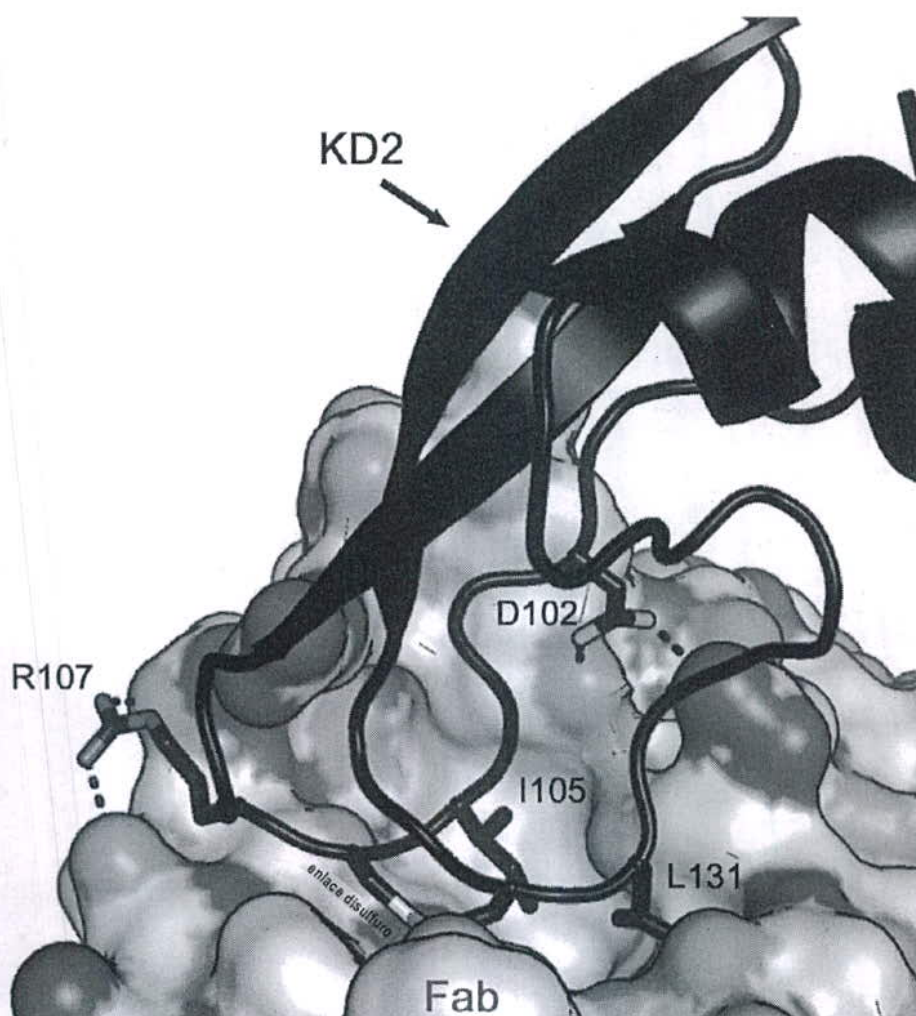


Figura 4

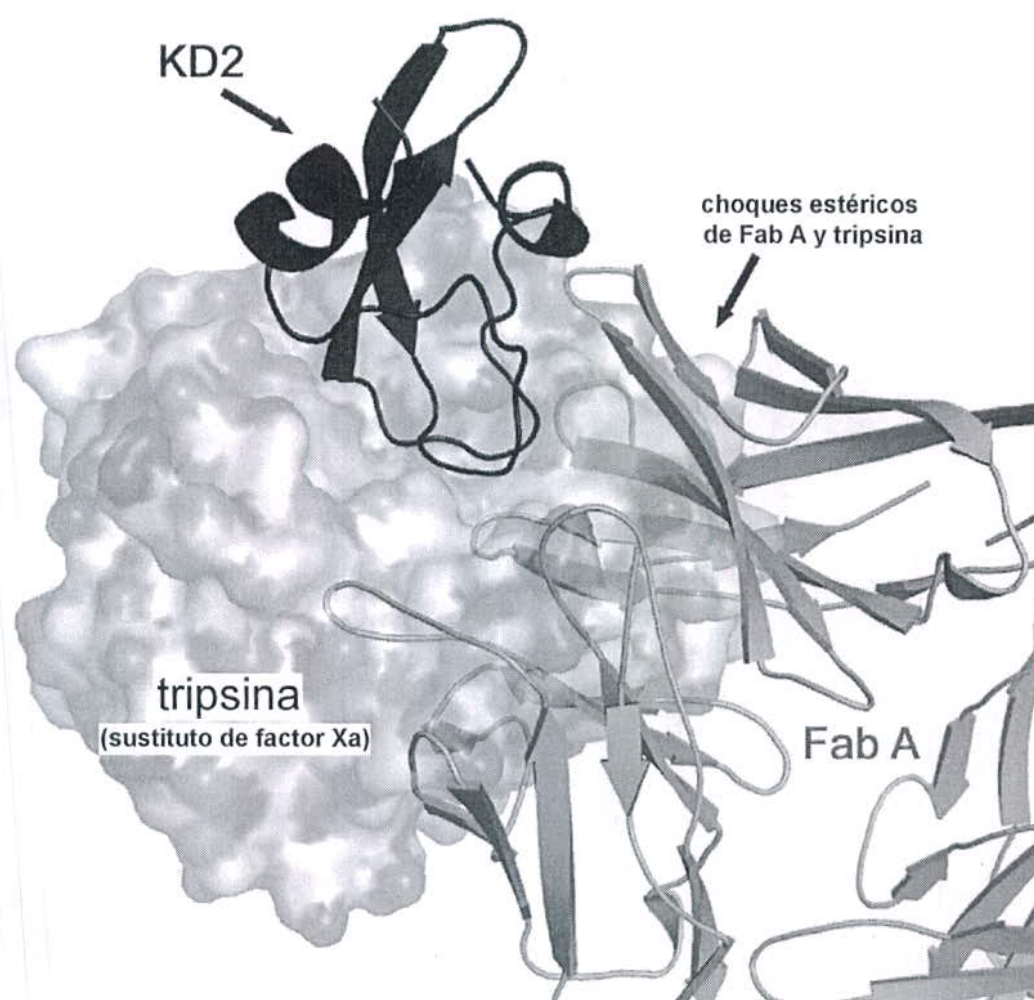


Figura 5

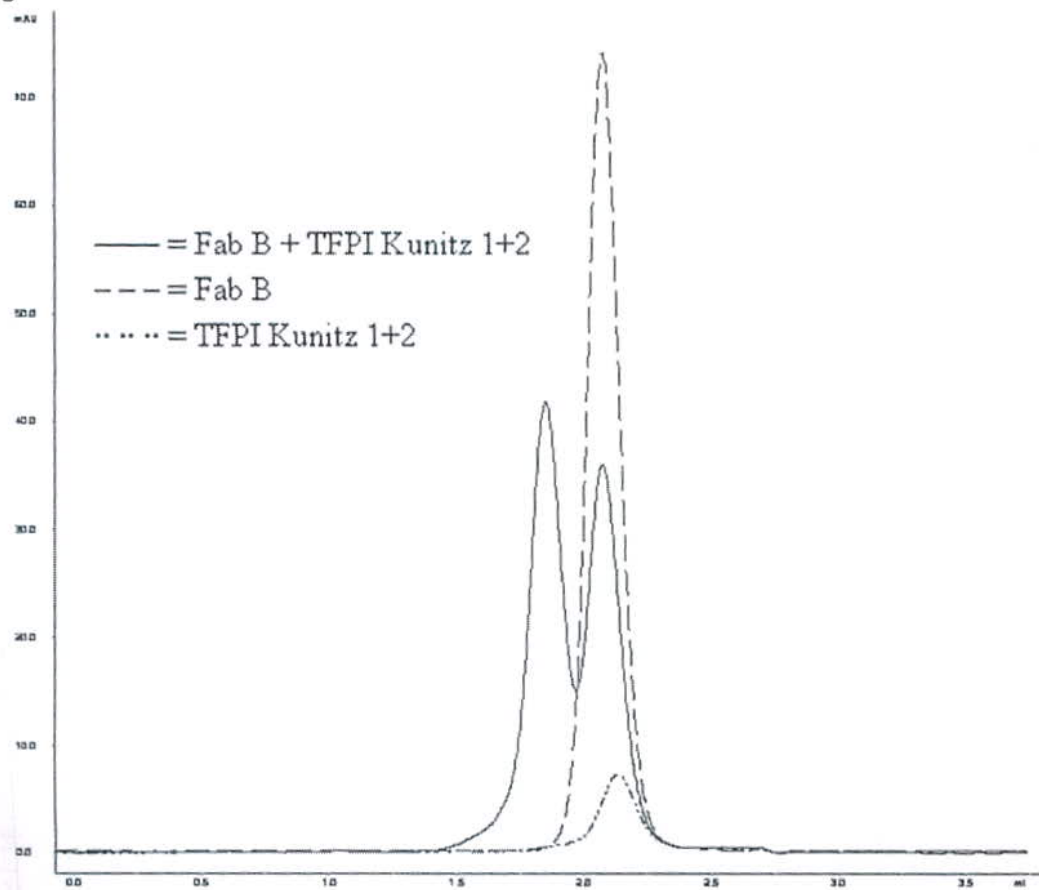




Figura 6

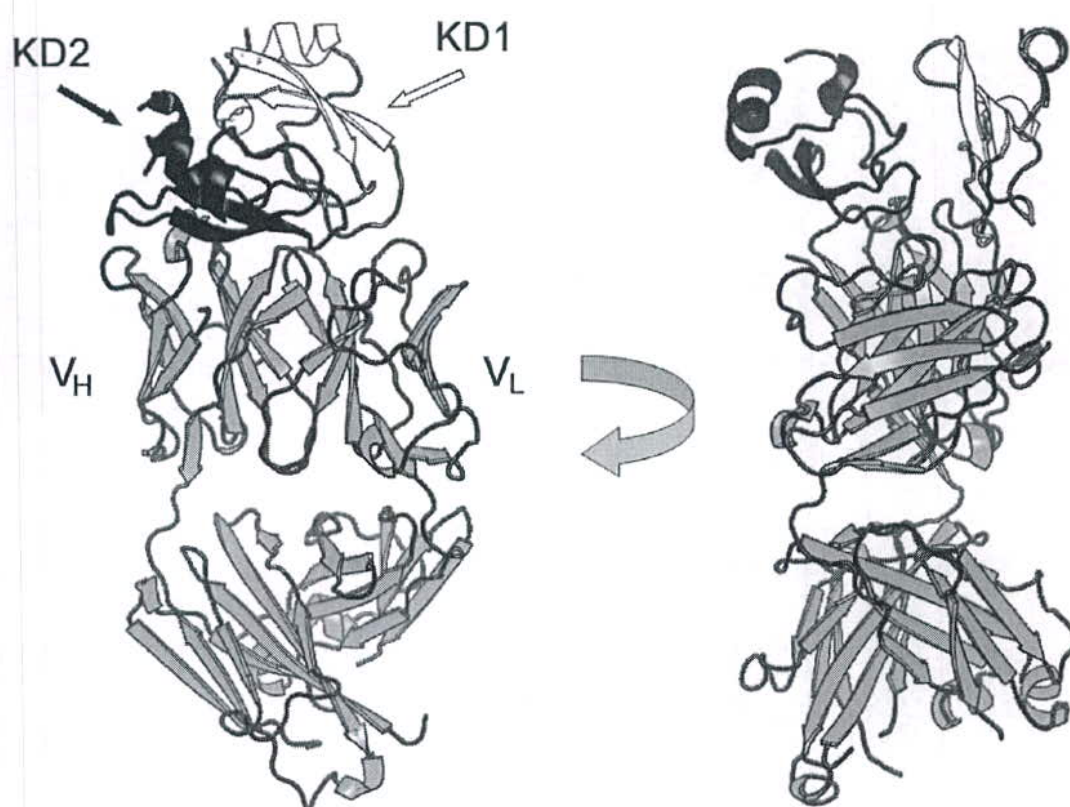


Figura 7

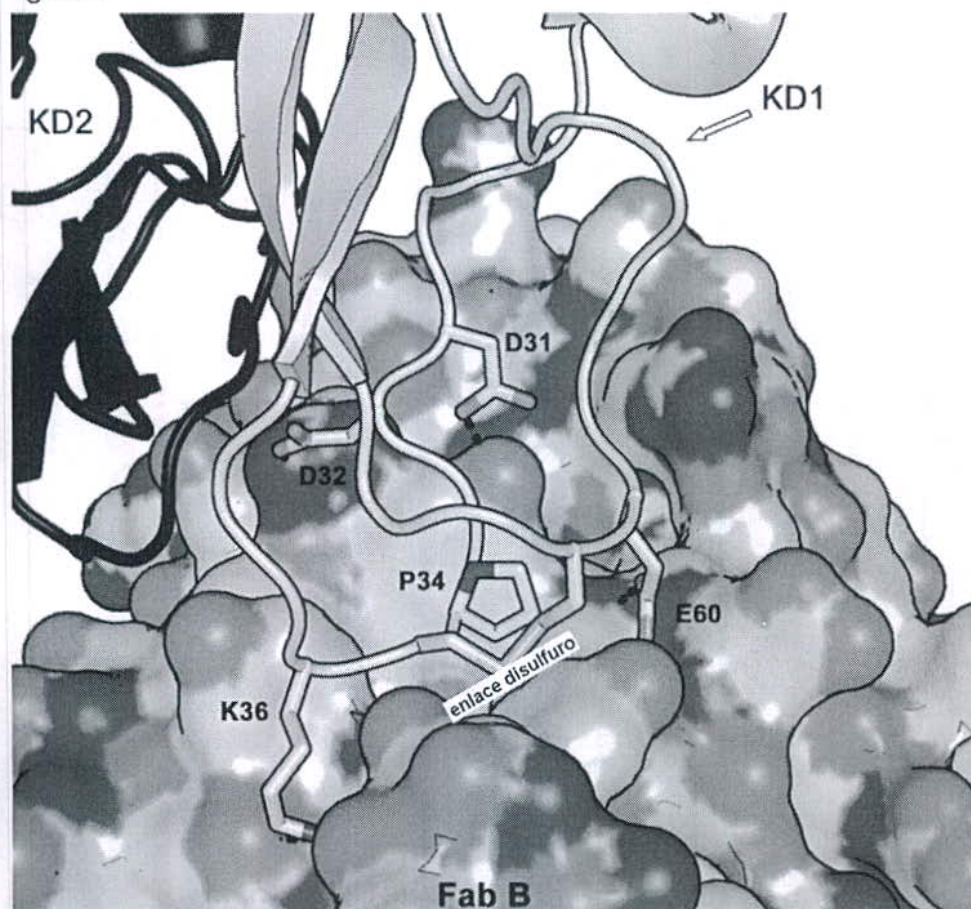


Figura 8

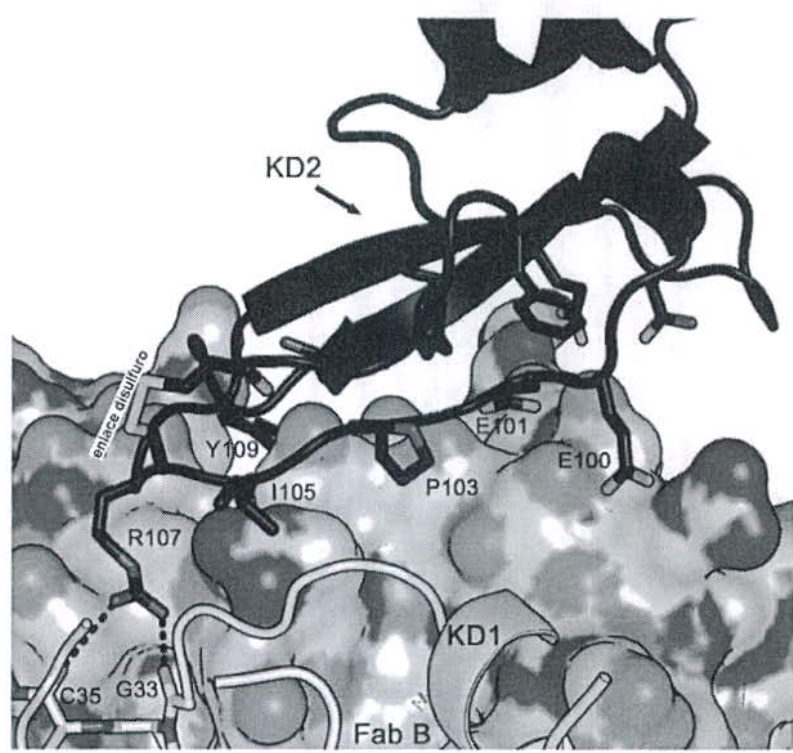
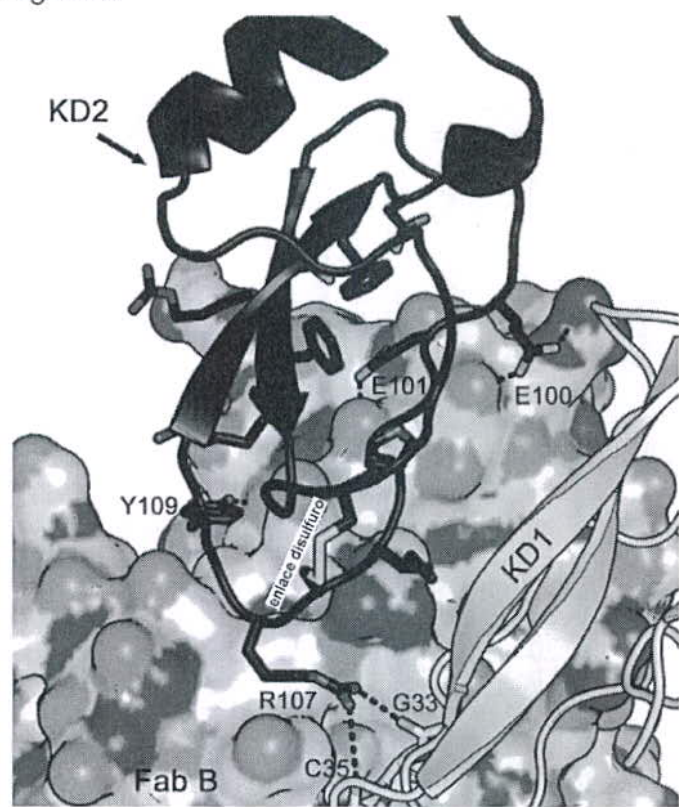


Figura 9

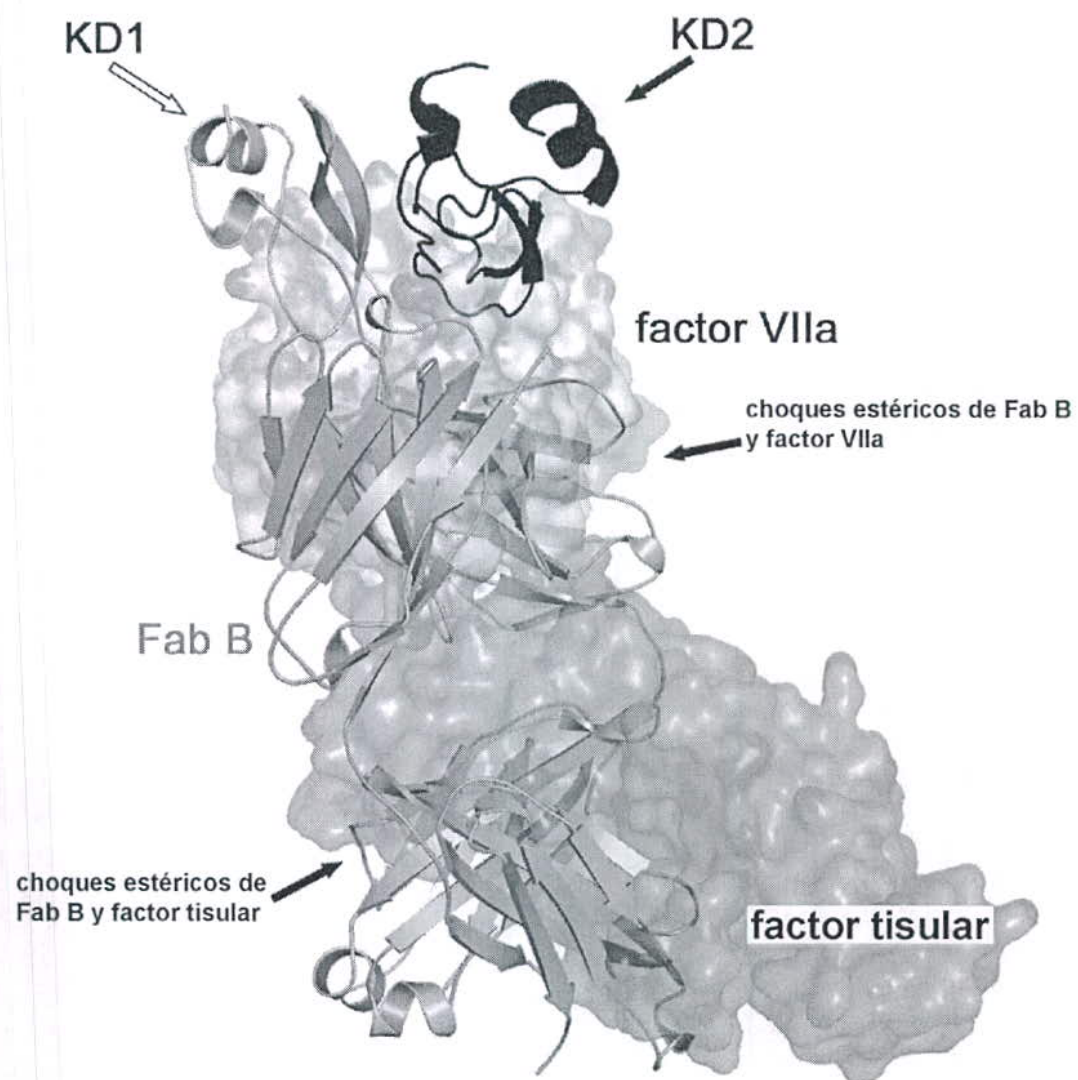


Figura 10

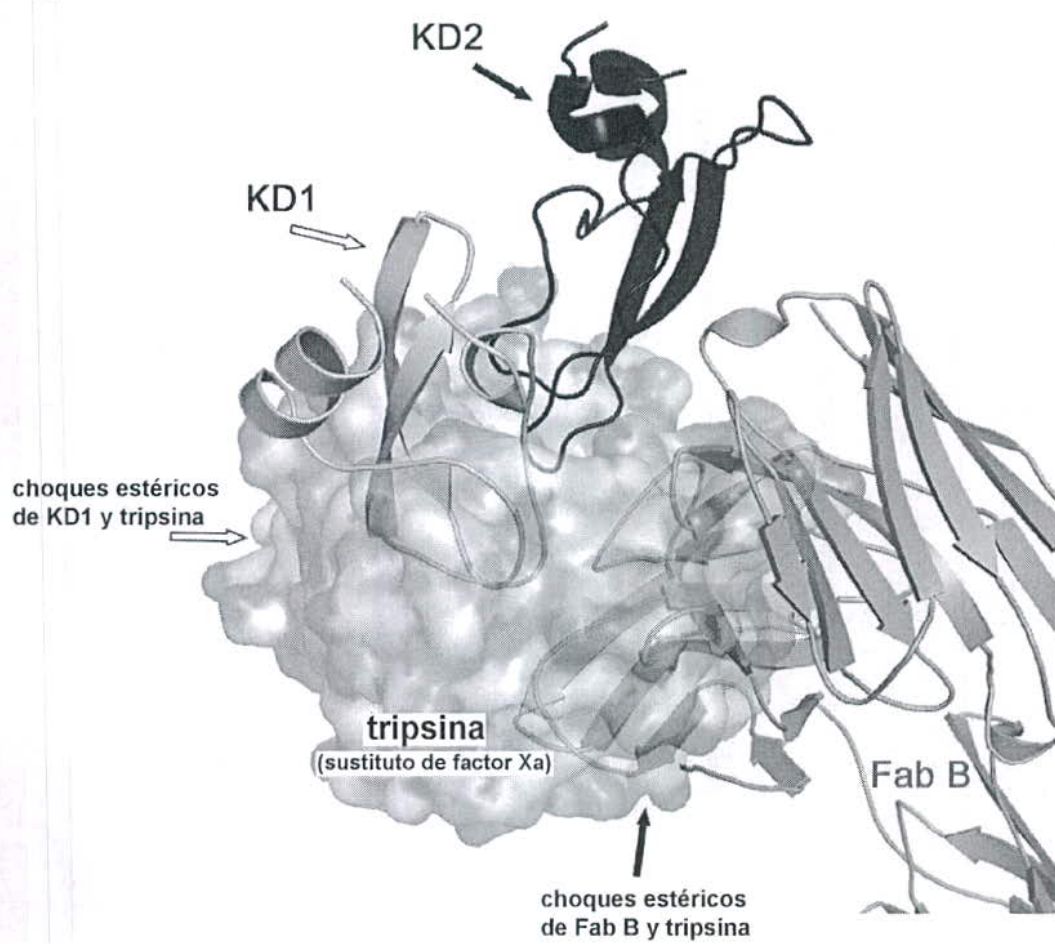


Figura 11

A**Cadena ligera:**

Fab A: 1 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVFS DGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA 60
 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVF DG TYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA
 Fab C: 1 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVFRDGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYKGSNRA 60

Fab A: 61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV 120
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
 Fab C: 61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQYDSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV 120

Fab A: 121 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL 180
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL
 Fab C: 121 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL 180

Fab A: 181 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE 218
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE
 Fab C: 181 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE 218

Cadena pesada:

Fab A: 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSA*AAWSWIRQSPGRGLEWLGIIYKRSKWKY 60
 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSS+SAAWSWIRQSP RGLEWLGIIY RSKWKY
 Fab C: 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSDSA*AAWSWIRQSPSRGLEWLGIIYRSKWKY 60

Fab A: 61 NRYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARWHS*DKHWGFDYWGQGTTLVT 120
 NRYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARWHS*DKHWGFD WGQGTTLVT
 Fab C: 61 NRYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARWHS*DKHWGFDWQGTTLVT 120

Fab A: 121 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL 180
 VSSASTKGPSVFPLAP S+STS TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 Fab C: 121 VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL 180

Fab A: 181 QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK 224
 QSSGLYSLSVVTVPSS+ GTQTY CNV+HKPSNTKVDK VE K
 Fab C: 181 QSSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVN*HKPSNTKVDKTV*ERK 224

B

KD2

hc_Asn32

Fab

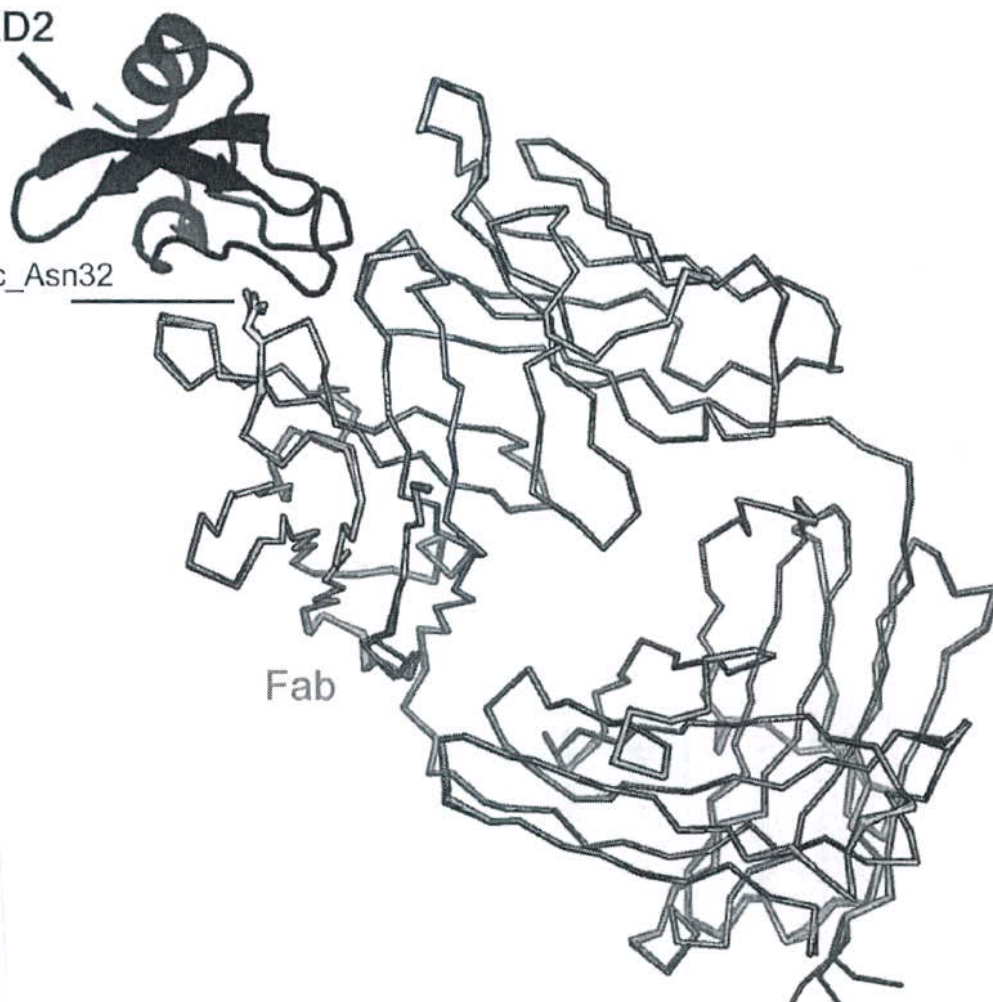


Figura 12

A

Cadena ligera:

Fab B: 1 DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNL^{**}RNY^{*}YAHWYQQKPGQAPVVVI^{*}YDNNRPSGIPER 60
 ELTQPPSVSV+PGQTARI+CSGDNL^{**}YYAHWYQQKPGQAPVVVI+YD NRPSGIPER
 Fab D: 1 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDNL^{**}PKYYAHWYQQKPGQAPVVVI^{*}YDNNRPSGIPER 60

Fab B: 61 FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSW^{**}DDGVPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120
 FSGSNSGNTATLTISGTQA DEADYYCQ+W PVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
 Fab D: 61 FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWWS^{**}STPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP 120

Fab B: 121 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKDSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSL 180
 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK DSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSL
 Fab D: 121 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSL 180

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

Cadena pesada:

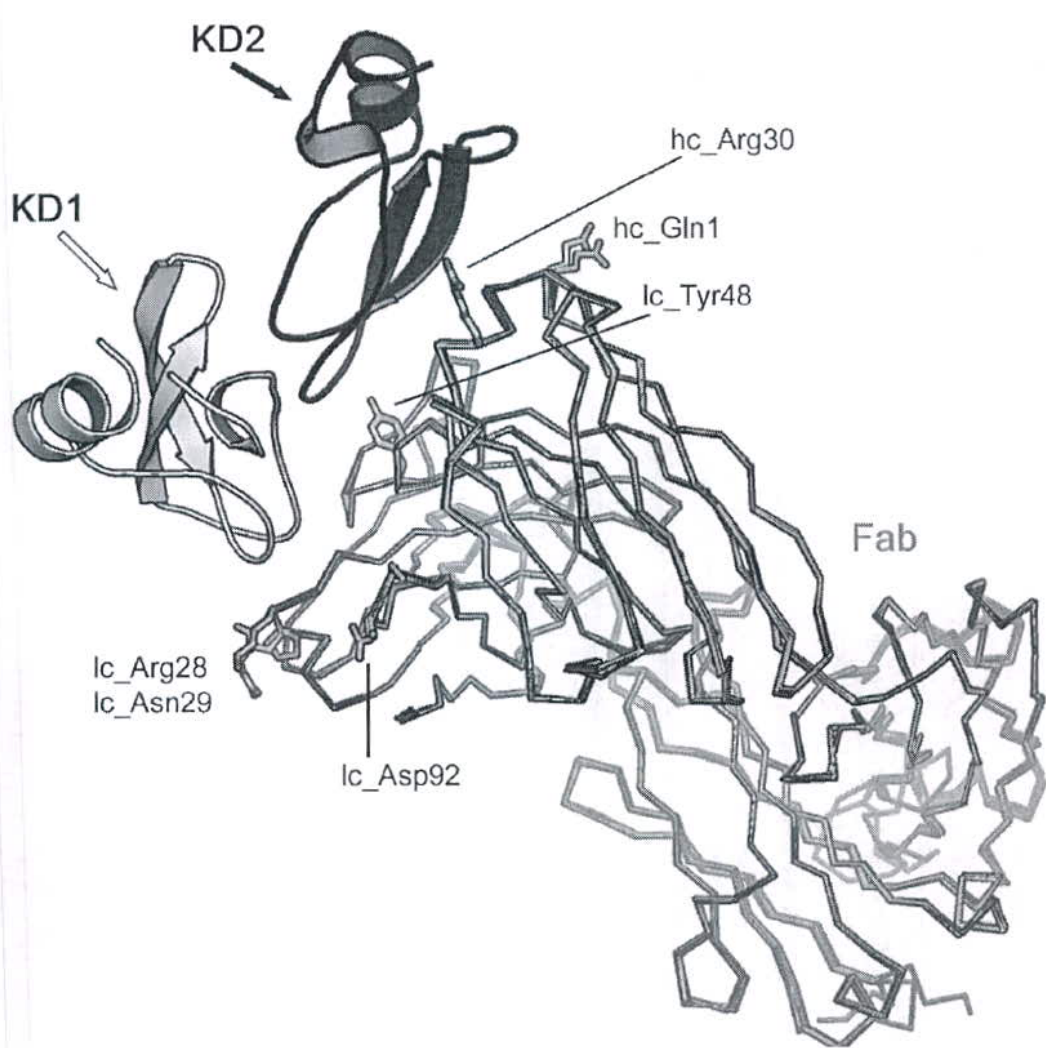
Fab B: 1 ^{*}QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG^{*}FTFRSYGMSWVRQAPGKGLEWVSSIRGSSSSTYY 60
 +V+LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SYGM WVRQAPGKGLEWVSSIRGS STYY
 Fab D: 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF^{*}SSYGMWVRQAPGKGLEWVSSIRGSRGSTYY 60

Fab B: 61 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{*}LYRYWFDYWGQGT^{*}LVTVSSAST 120
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGT^{*}LVTVSSAST
 Fab D: 61 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLYRYWFDYWGQGT^{*}LVTVSSAST 120

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

Fab B: 181 SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC 220
 SLSSVVTVPSS+ GTQTY CNV+HKPSNTKVDK VE K C
 Fab D: 181 SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV^{*}DHKPSNTKVDK^{*}TV^{*}ERKCC 220

B



92

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING
LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Bayer HealthCare LLC
Wang, Zhuozhi
Murphy, John
Marquardt, Tobias
Moosmayer, Dieter
- <120> Anticuerpos monoclonales frente al inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI)
- <130> BHC 11 5 001
- <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 276
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 1

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

98

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING

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

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

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

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

Val Lys Asn Met
275

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

<400> 2

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING

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

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

<210> 3
<211> 225
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser
225

100

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING

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

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 5
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

101

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 6

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

103

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Cys
225

<210> 8
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING
Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

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

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

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

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 9
<211> 219
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

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

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

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

65

BHC 11 5001 PCT CL SEQUENCE LISTING
Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
210 215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0098743

Bogotá D.C., Octubre 01 de 2013 - 14:57:51

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA NI 800.020.909

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532921255	01/10/2013	9.270.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. Pa / 05 2012 / 031338

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-233113- -00000-0000

Fecha: 2013-10-01 16:18:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mai: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Octubre 1 de 2013 - 14:57:53

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0098741

Bogotá D.C., Octubre 01 de 2013 - 14:57:51

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA NI 800.020.909

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532921255	01/10/2013	9.270.000.00

*** Conceptos Pagados ***

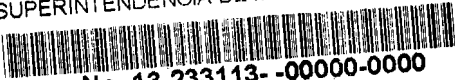
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
27	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	810.000.00
				\$810.000.00

SON: *OCHOCIENTOS DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. PCT/UP2012/031538

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-233113-00000-0000

Fecha: 2013-10-01 16:18:40 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 1 de 2013 - 14:57:53

PATENTE DE INVENCION ☒ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(71) Solicitante(s) **BAYER HEALTHCARE LLC**

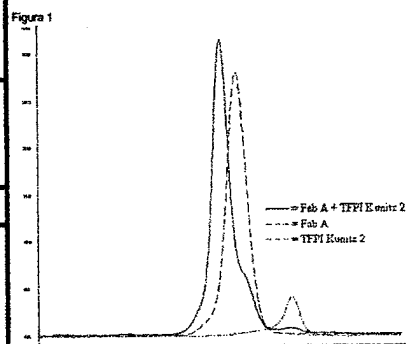
(72)Inventor(es): WANG, Zhuozhi; MURPHY, John; MARQUARDT, Tobias; MOOSMAYER, Dieter

(74) Apoderado: **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		61/471.101		01/04/2011		US

No. de solicitud **PCT/US2012/031538**

No. Publicación: **WO2012/135671 A2**



(54) Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL INHIBIDOR DE LA RUTA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)**

(57) Resumen: Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados que se unen a epítomos específicos del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (TFPI) y las moléculas de ácido nucleico aisladas que los codifican. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti-TFPI y procedimientos de tratamiento de deficiencias o defectos en la coagulación por la administración de los anticuerpos.

CONTINUA AL RESPALDO

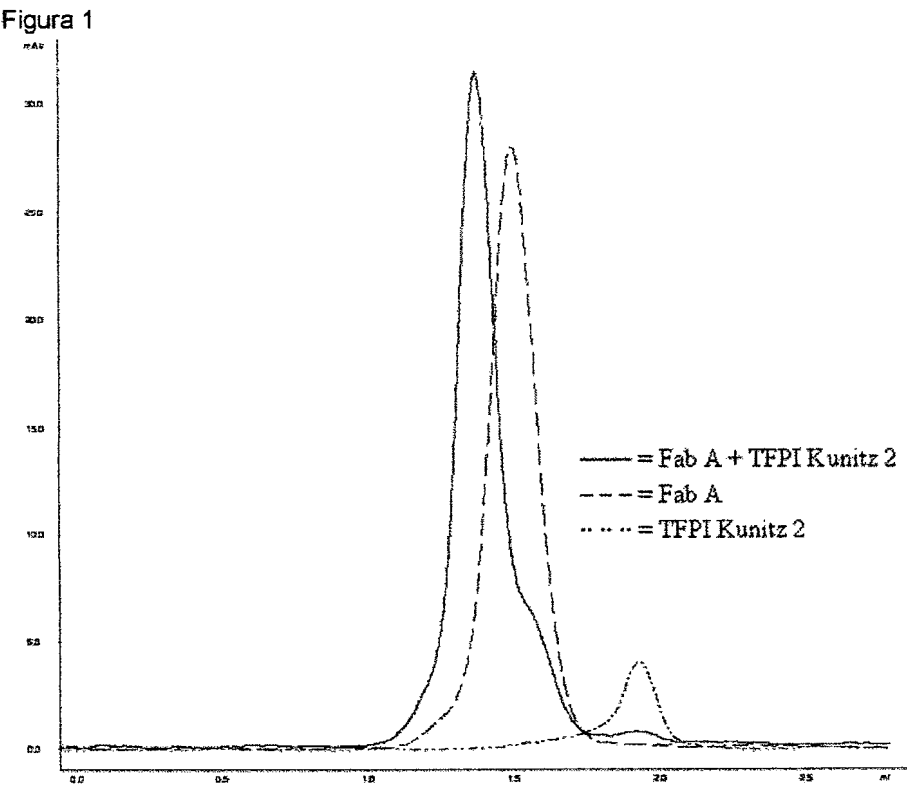
6a

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO						
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES						
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS						
PATENTE DE INVENCION <u> X </u> PCT <u> X </u> MODELO DE UTILIDAD <u> </u> DISEÑO INDUSTRIAL <u> </u>						
(21) N° de solicitud:				(22) Fecha de solicitud:		
(51) Clasificación Internacional :						
(71) Solicitante (s) BAYER HEALTHCARE LLC						
(72) Inventor(es) WANG, Zhuozhi; MURPHY, John; MARQUARDT, Tobias; MOOSMAYER, Dieter						
(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS						
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	32)	Fecha	(33)	País
		61/471,101		01/04/2011		US
(85) Fecha inicio fase nacional: 01/11/2013				,m	Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				(87)	Fecha: 04/10/2013 Fecha (dd/mm/aa)	
Fecha de presentación de la solicitud: 30/03/2012					N° publicación: WO2012/135671 A2	
No. de solicitud PCT/US2012/031538						
(54) Titulo: ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL INHIBIDOR DE LA RUTA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)						

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) No. Prioridad 61/471,101 (32) Fecha 01/04/2011 (33) Pais US		(51) Int Cl: (71) Solicitante(s) BAYER HEALTHCARE LLC (72) Inventor(es) WANG, Zhuozhi MURPHY, John MARQUARDT, Tobias MOOSMAYER, Dieter (74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 01/11/2013 Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30/03/2012 No. de solicitud PCT/US2012/031538		(87) Publicación Internacional Fecha: 04/10/2013 Fecha (dd/mm/aa) N° publicación: WO2012/135671 A2	
(54) Titulo: ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL INHIBIDOR DE LA RUTA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)			

Resumen:

Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados que se unen a epítopos específicos del inhibidor de la ruta del factor tisular humano (TFPI) y las moléculas de ácido nucleico aisladas que los codifican. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti-TFPI y procedimientos de tratamiento de deficiencias o defectos en la coagulación por la administración de los anticuerpos.



COLOMBIA

The Undersigned Juan Pedro Vallejo López, adult and living in Madrid, Spain, in my position of legal Representative of the company **Bayer HealthCare LLC** domiciled at 36 Columbia Road, Morristown, NJ 07962, USA which was initially incorporated in New Jersey, USA, grant ample an sufficient power of attorney to: **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS** and/or **CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS**, attorneys, adults, residing in Bogotá (Colombia), so that on our behalf and representation, carry out in Colombia and in any other Countries all types of errands an especial procedures for the registration and renewal of all kinds of Product and Service trademarks, deposits of name and commercial logotype, industrial models and drawings, invention patents, utility models, Integrated circuits, name of domain, Copyrights, plant varieties, agricultural, veterinary and sanitary registries, capacity certificates, renewal, modification, transfer, assignment and expansions and to be responsible as general attorneys, for the supervision of all matters related to industrial and Intellectual property, being empowered to present and withdraw objections, to present appeals, to request testimonies, to receive documents, to pay legal fees, to approve exploitations, to agree on transactions on trademark agreements' with third parties of legal entities, to abandon action, to substitute and to carry out all the necessary actions before any administrative authority of the aforementioned purposes' in the event that such procedures shall be transferred unto a judicial field, the legal representatives are authorized to act as plaintiff or defendant before the competent authorities, having an ample power to settle, to submit to arbitration, to waive, to present appeals and all other necessary special faculties. For that purpose, I kindly request to grant ample powers to our attorneys, who shall be able to exercise the functions independently or collectively. The present power of attorney revokes and cancels any other previous powers of attorney given by the Company in the territory of the Colombian Republic. Sincerely,

ID Card No.

issued in

Notarial Certificate:

The undersigned Notary Public certifies that the preceding signature reading Juan Pedro Vallejo López is authentic: that signer is legal representative of

Bayer HealthCare LLC and that he is empowered to grant this power, and that said Company exists and is duly organized in accordance with the laws of New Jersey, USA. All the foregoing facts are known to the Notary due to his having examined the respective documents to which he, the Notary, attests.

Granted and signed, at Madrid, on January 18, 2012

Notary Public.

This Power of Attorney should be authenticated with the filed Notarial certificate and legalized by Apostille or by the Colombian Consulate.

Atentamente se dirige a usted Juan Pedro Vallejo López mayor de edad y residente en Madrid, España, para manifestarle que en mi condición de Representante legal de la firma **Bayer HealthCare LLC**, domiciliado en 36 Columbia Road, Morristown, NJ 07962, USA constituida inicialmente en Nueva Jersey, E.E.U.U., confiero poder general, amplio y suficiente a los Dres. **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**, y/o **CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS**, Abogados, mayores y vecinos de Bogotá, D.C. (Colombia), para que en nuestro nombre y representación adelanten en Colombia y en otros países toda clase de diligencias y procedimientos especiales para el Registro y Renovación en su Despacho, de toda clase de Marcas de Producto y Servicio, Depósitos, de Nombre y Enseña Comercial, Diseños Industriales y Patentes de Invención, Patentes modelo de Utilidad, Esquemas de Circuitos integrados, Nombres de dominio, Derechos de Autor, Variedades vegetales, registros agrícolas, veterinarios y sanitarios, certificados de capacidad, renovación, modificación, traspaso y ampliación de los mismos y atiendan como Apoderados generales todo asunto referente a la Propiedad Industrial e intelectual, quedando facultados para presentar y retirar Oposiciones, interponer recursos, solicitar testimonios, recibir documentos, cancelar costos legales, probar explotaciones, aceptar transacciones, llegar a acuerdos marcarios con terceras personas o entidades jurídicas, desistir, sustituir y hacer cuanto fuere necesario ante cualquier autoridad administrativa para los fines arriba indicados; y en caso de que el procedimiento debiera pasar a conocimiento judicial, quedan facultados para actuar como demandantes o demandados ante los Jueces que sean competentes, con poder amplio, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, interponer recursos y con todas las demás facultades especiales que fueren necesarias.

Con éste objeto, ruego le confieran personería suficiente a nuestros Apoderados quienes podrán obrar en forma conjunta o independiente e incluso sustituir el presente poder.

Atentamente,

DNI

expedido en

Certificación Notarial:

El infrascrito Notario Público certifica que la firma que antecede y dice Juan Pedro Vallejo López es auténtica: que el firmante es representante legal de

Bayer HealthCare LLC que tiene facultad para otorgar este poder y que dicha compañía existe y está debidamente organizada de conformidad con las Leyes de Nueva Jersey, E.E.U.U..

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado Madrid, el 18 de Enero de 2012.

Notario Público.

Autenticarlo ante Notario con el lleno de la Certificación Notarial y refrendarlo por Apostilla o Consulado.

LEGITIMACIÓN.- Yo, SALVADOR MIRAS GÓMEZ, Notario de Madrid, LEGITIMO la firma y rúbrica que antecede de D. JUAN PEDRO VALEJO LÓPEZ, quien declara y reconoce como suyas las indicadas firma y rúbrica estampadas en el presente documento, del cual ha quedado constancia mediante acta autorizada por mí conforme al artículo 207 del Reglamento Notarial el día 7.02.12, bajo el número 222 de orden de mi Protocolo.- En Madrid, a 7.02.12.- DOY FE.-

SELLO DE
LEGITIMACIONES Y
LEGALIZACIONES

NIHIL PRIUS FI

A081

FE PÚBLICA
NOTARIAL

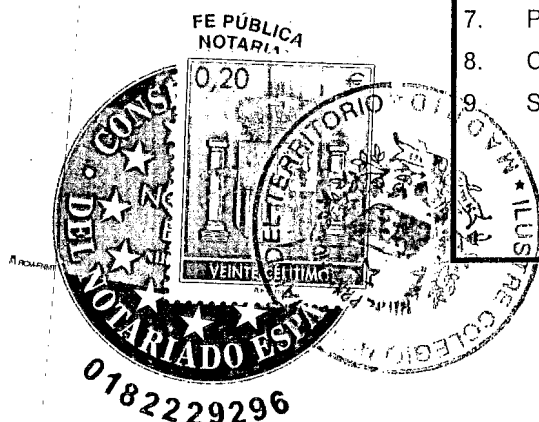


Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. País: *España*
El presente documento público
2. Ha sido firmado por D. **Salvador Miras Gómez**
3. Actuando en calidad de **NOTARIO**
4. Se halla sellado / timbrado con *el de su Notaría*

CERTIFICADO

5. En Madrid
6. El **12 . marzo . 2012**
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid.
8. Con el número 22293
9. Sello / timbre:
10. Firma



Don Fernando Pérez Alcalá del Olmo
Firma delegada del Decano

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
Dependencia: 2020	Fecha: 13 / 10 / 01 / AAAA MM DD	Recorrido: 3	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-233113 -	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El CD Anexo contiene un total de 1 Archivo.
1 en formato de blok de nota el cual
por no cumplir con lo estipulado en la
Circular Única no fue procesado.



No. 13-233113- -00000-0000

Fecha: 2013-10-01 16:18:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UT

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen).
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐