Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación	16 47290 0000 0000	2016-02-24 15:12:31	
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I	
Actuación	411	PRESENTACION	Folios: 249
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	
Pago #1	17373	$ 229000	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	**Titulo de la Invención** (200 caractares o espacios máximos)
	ANTICUERPOS CONTRA EL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO TIPO 1 (PAI-1) Y USOS DE LOS MISMOS

2	**Datos del Solicitante**			
	Nombre:	SANOFI	**Dirección Electrónica:**	sic@castellanosyco.co
	Dirección:	54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA	**Domicilio/País de constitución:**	FRANCIA - PARIS - PARIS

Identificación:

- ☐ CEDULA DE CIUDADANIA
- ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
- ☒ EMPRESA EXTRANJERA
- ☐ NIT
- ☐ PASAPORTE

Número: 1047836-

3	**Solicitantes**		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	**Tipo**	**Identificación**
1.	SANOFI	NN	1047836

4	**Datos del Inventor**

Nombre:	ALLA PRITSKER	**Dirección Electrónica:**	sic@castellanosyco.co
Dirección:	c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, NJ 08807, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - NEW JERSEY - BRIDGEWATER

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA

☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT

☐ PASAPORTE ☒ No Aplica

Número: -

5	**Inventor(es)**

Apellidos - Nombres	**Domicilio**
1. PRITSKER ALLA	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2. MORGAN CHRISTOPHER RYAN	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
3. GRAILHE PATRICK	FRANCIA
4. RAK ALEXEY	FRANCIA
5. MATHIEU MAGALI	FRANCIA
6. BAURIN NICOLAS	FRANCIA
7. POIRER BRUNO	FRANCIA
8. DUFFIEUX FRANCIS	FRANCIA
9. JANIAK PHILIP	FRANCIA
10. DAVEU CYRIL	FRANCIA
11. LI HAN	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

12.	KOMINOS DOROTHEA	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6	Datos Inventor(es)

	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	NEW JERSEY	BRIDGEWATER	c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, NJ 08807, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	NEW JERSEY	BRIDGEWATER	c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, NJ 08807, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
3.	FRANCIA	PARIS	PARIS	c/o Sanofi, 54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA
4.	FRANCIA	PARIS	PARIS	c/o Sanofi, 54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA
5.	FRANCIA	PARIS	PARIS	c/o Sanofi, 54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA
6.	FRANCIA	PARIS	PARIS	c/o Sanofi, 54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA
7.	FRANCIA	PARIS	PARIS	c/o Sanofi, 54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA

8.	FRANCIA	PARIS	PARIS	c/o Sanofi, 54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA
9.	FRANCIA	PARIS	PARIS	c/o Sanofi, 54 rue La Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA
10.	FRANCIA	PARIS	PARIS	5 rue Dupont des Loges, F-75007 Paris, FRANCIA
11.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	YARDLEY	388 Twig Lane, Yardley, PA 19067, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
12.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	NEW JERSEY	MORRISTOWN	99 Rolling Hill Drive, Millington, NJ 07946, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

7	**Datos del Representante Legal / Apoderado**		
Nombre:	MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	**Dirección Electrónica:**	sic@castellanosyco.co
Dirección:	CALLE 94A 7A 09	**Domicilio/País de constitución:**	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.

Identificación:

☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA

☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT

☐ PASAPORTE

Número: 39779654-

Presentación de Poder

Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	**Datos Solicitud: PCT / WO**		
Número Solicitud:	PCT/US2014/050896	**Fecha Solicitud:**	13/08/2014

Número Publicacion:	WO 2015/023752	Fecha Publicacion:	19/02/2015

9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha _
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/865.451	13/08/2013
2.	EUROP PATENT ORGANIZATION(EPO)	EP	14305757.8	22/05/2014

10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:	15	Pago Reivindicaciones:	Si	

11	Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ 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 resolucón 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

12	Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☐ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional
☒ Listado de secuencias
☐ Artes finales 12 x 12 cm
☒ Poderes, si fuere el caso
☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
☒ Otros Anexos

ANTICUERPOS CONTRA EL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO 1 (PAI-1) Y USOS DE LOS MISMOS

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Núm. 61/865.451, presentada el 13 de Agosto de 2013, y la Solicitud de Patente Europea Núm. 14305757.8, presentada el 22 de Mayo 2014, que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Antecedentes

El inhibidor del activador de plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) es el principal inhibidor del activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA) y del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), las serina proteasas clave responsables de la generación de plasmina. El PAI-1 regula la fibrinolisis mediante la inhibición de la activación del plasminógeno en el compartimento vascular. La fibrinolisis es un proceso estrechamente coordinado para degradar los coágulos de fibrina formados por la activación de la cascada de coagulación. La desregulación del equilibrio de coagulación/fibrinolisis conduce a los eventos de hemostasia anormales como sangrado o enfermedades trombóticas. El PAI-1 también es un regulador clave de la activación del plasminógeno en el compartimento pericelular (intravascular y tisular) donde el receptor del plasminógeno unido es activado principalmente por la uroquinasa unida al receptor de uroquinasa (uPAR). Al inhibir la proteolisis pericelular, el PAI-1 regula numerosas funciones celulares como la degradación de la matriz extracelular (ECM), la activación de factores de crecimiento y la liberación de ECM, la activación de metaloproteinasas de la matriz (MMP) y la apoptosis celular. Recientemente, se han identificado efectos independientes de proteasa del PAI-1 a través de su interacción con cofactores (como vitronectina, heparina, glicosaminoglicanos), complejos uPAR-uroquinasa o receptores celulares (PRL: proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad) o integrinas que afectan funciones celulares como la adherencia/desadherencia, la migración, la proliferación y la bioactividad intracelular. Por medio de estos mecanismos celulares y efectos anti-fibrinolíticos, se ha establecido un papel patogénico de PAI-1 en el crecimiento tumoral y la metástasis, la fibrosis, el infarto agudo de miocardio y trastornos metabólicos como la aterosclerosis, la obesidad y la diabetes.

El gen de SERPINA1 humana (PAT-1) está localizado en el cromosoma 7, consiste en ocho intrones y nueve exones, y tiene un tamaño de 12.169 b (Klinger, K.W.

et al. Proc. Natl. Acad. ScI. USA 84:8548, 1987). El PAI-1 es una glicoproteína de cadena sencilla de aproximadamente 50 kDa (379 aminoácidos) de la superfamilia de la SERPINA (inhibidor de serina proteasa) que se sintetiza en la conformación activa, pero de manera espontánea se hace latente en ausencia de vitronectina (Vn). La vitronectina, el cofactor principal de PAI-1, estabiliza la conformación activa reactiva con el Bucle del Centro Reactivo (RCL) que tiene aproximadamente 20 aminoácidos que están expuestos en la superficie. El mecanismo de inhibición de las dos dianas principales de PAI-1 (tPA y uPA) es una inhibición suicida. La región RCL de PAI-1 porta el enlace peptídico cebo (R346-M347, también denominado P1-P'1), que porta el sitio de corte para esta serina proteasa. Se forma primero un complejo de Michaelis con tPA o uPA, a continuación, la tríada catalítica reacciona con el enlace peptídico cebo para formar un complejo de enzima acilada que, después de la escisión del enlace peptídico P1-P'1, induce fuertes cambios de conformación. Los cambios conformacionales causan la inserción del RCL escindido en una hebra β permaneciendo la proteasa unida covalentemente en forma de una enzima acilada con PAI-1. En circunstancias no fisiológicas, la hidrólisis de este complejo de enzima acilada puede inducir la liberación del PAI-1 escindido y proteasa activa libre (Blouse *et al., Biochemistry,* 48: 1723, 2009).

El PAI-1 circula en la sangre a niveles muy variables (rango nM) y en exceso sobre las concentraciones de t-PA o uPA. El PAI-1 exhibe flexibilidad estructural y se puede encontrar en una de tres conformaciones: (1) una conformación latente, (2) una conformación activa, o (3) una conformación sustrato (véase la Figura 1). El PAI-1 se encuentra principalmente en forma de un complejo no covalente con vitronectina (Kd ~ 1 nM) que disminuye la transición de latencia en 1,5 a 3 veces. La afinidad de PAI-1 latente, escindida o complejada por la vitronectina se reduce significativamente. La vitronectina unida a la matriz también se localiza con PAI-1 en el espacio pericelular. Las células endoteliales, los monocitos, los macrófagos y las células musculares lisas vasculares sintetizan este PAI-1 que a continuación puede ser almacenado en grandes cantidades en forma latente por las plaquetas (en gránulo α). El PAI-1 es un inhibidor rápido y específico (con la constante de velocidad de segundo orden de 10^6 a 10 $M^{-1}s^{-1}$) de tPA y el uPA en solución, pero inactivo contra la proteasa unida ya sea a fibrina o a sus receptores celulares. Otras proteasas como la trombina, plasmina, la Proteína C activada también pueden ser inhibidas por PAI-1, pero menos eficientemente.

Se han resuelto diversas estructuras 3D de PAI-1 humano desde la primera descrita en 1992 (Mottonen *et al., Nature 355*: 270, 1992) en conformación latente. Estas estructuras 3D incluyen formas mutantes de PAI-1 en el sustrato (Aertgeerts *et al.,*

Proteins 23: 118, 1995), conformación activa estabilizada (Sharp *et al., Structure* 7: 111, 1999), PAI complejado con dominio somatomedina B de vitronectina (Zhou *et al., Nat. Struct. Biol.* 10:541, 2003) o con la inhibición de pentapéptido desde el bucle RCL (Xue et al., *Structure* 6:627, 1998). Más recientemente, estructura de PAI-1 de ratón en la conformación latente fue aclarada por Dewilde et al. (*J. Struct. Biol.* 171:95, 2010) y reveló diferencias con PAI-1 humano en la posición RCL, la región reguladora y la posición de la hélice α A. Las relaciones estructura/función de PAI-1 se han estudiado mediante el uso de más de 600 proteínas mutantes (revisado por De Taeye *et al., Thromb. Haemost.* 92:898, 2004) para localizar los dominios implicados en diversas actividades de esta serpina multifuncional.

Puesto que PAI-1 puede se sintetizado por casi todos los tipos de células incluyendo hepatocitos, adipocitos, células mesangiales, fibroblastos, miofibroblastos, y células epiteliales, su expresión varía en gran medida en condiciones fisiológicas (p. ej., variación circadiana del nivel de PAI-1 en plasma) y condiciones patológicas (p. ej., obesidad, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, infecciones, enfermedades inflamatorias, cáncer). Se considera que PAI-1 es una proteína de fase aguda. La regulación transcripcional de la expresión del ARNm de PAI-1 es inducida por varias citoquinas y factores de crecimiento (p. ej., TGFp, TNFrx, EGF, FGF, insulina, angiotensina II y IV), hormonas (p. ej., aldosterona, glucocorticoides, PMA, alta glucosa) y factores de estrés (p. ej., hipoxia, especies reactivas del oxígeno, lipopolisacáridos).

Además, un polimorfismo en el promotor (posición - 675) del gen PAI-1 afecta al nivel de expresión. El alelo 4G aumenta el nivel de PAI-1 y la variante 4G/4G (que aparece en aproximadamente 25% de la población) induce un aumento de aproximadamente 25% del nivel plasmático de PAI-1 en comparación con 5G/5G (aparición en 25% y 4G/5G aparición en 50%). El polimorfismo 4G/4G se ha relacionado con infarto de miocardio (Dawson *et al.*, *Arterioscler Thromb.* 11:183, 1991), un tipo específico de fibrosis pulmonar (neumonía intersticial idiopática) (Kim *et al., Mol Med.* 9:52, 2003) y el grupo donante de genotipo 4G/4G es un factor de riesgo independiente de pérdida del injerto renal debido a la fibrosis intersticial y atrofia tubular (Rerolle *et al., Nephrol. Dial. Transplant* 23: 3325, 2008).

Se han atribuido diversos papeles patogénicos a PAI-1 en enfermedades trombóticas tales como la trombosis arterial y venosa, el infarto de miocardio agudo, y la aterosclerosis. Su participación en trastornos metabólicos como el síndrome de resistencia a la insulina y la obesidad es bien reconocida. El PAI-1 es también conocido como un factor profibrótico para varios órganos y se ha demostrado que es expresado en

exceso en los tejidos fibróticos (es decir, hígado, pulmón, riñón, corazón, adherencias abdominales, piel: cicatriz o esclerodermia) (revisado por Ghosh y Vaughan, *J. Cell Physiol* 227:493, 2012). Los ratones con el gen de PAI-1 desactivado (KO) están protegidos de la fibrosis en diferentes modelos, tales como hígado (ligadura del conducto biliar o xenobiótico), riñón (modelo de obstrucción del ureteral unilateral (OUU)), pulmón (inhalación de bleomicina) (Bauman *et al., J. Clin. Invest.* 120:1950, 2010; Hattori *et al., Am. J. Pathol* 164:1091, 2004; Chuang-Tsai *et al., Am J. Pathol* 163:445, 2003), mientras que en el corazón esta supresión protege de la fibrosis inducida (Takeshita *et al., AM. J. Pathol.* 164:449, 2004), pero predispone a la fibrosis cardiaca selectiva dependiente de la edad (Moriwaki *et al., Cric. Res.* 95:637, 2004). Se ha informado de que la regulación a la baja de la expresión de PAI-1 por ARNip (Senoo *et al., Thorax* 65: 334, 2010) o la inhibición por compuestos químicos (Izuhara *et al., Arierioscler Thromb. Vasc. Biol.* 28:672, 2008; Huang *et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46:87, 2012) disminuye la fibrosis pulmonar, mientras que la expresión en exceso de PAI-1 de tipo salvaje (Eitzman *et al., J. Clin. Invest.* 97:232, 1996) o de un mutante de PAI-1 que conserva la solo la unión a vitronectina pero no la función inhibidora de tPA exacerba la fibrosis pulmonar (Courey *et al., Blood* 118: 2313, 2011).

La fibrosis hepática por ligadura del conducto biliar (BDL) es atenuada por anticuerpos neutralizadores de PAI-1 (Patente de Estados Unidos Núm. 7.771.720), mientras que la regulación a la baja por ARNip y atenúa la BDL fibrosis hepática inducida por xenobióticos (Hu *et al., J. Hepatol.* 51:102, 2009). Los ratones con PAI-1 desactivado estaban protegidos de daño hepático inducido por coleostasis y fibrosis en BDL (Bergheim et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:592, 2006; Wang *et al., FEBS Lett*. 581:3098, 2007; Wang *et al., Hepatology* 42:1099, 2005) y de la fibrosis hepática inducida por angiotensina II (Beier *et al., Arch. Bioch. Biophys* 510:19, 2011).

Los ratones con PAI-1 desactivado están protegidos de la fibrosis renal en el modelo de OUU, en la nefropatía diabética (Nicholas *et al., Kidney Int.* 67: 1297, 2005) (Oda *et al., Kidney Int.* 60, 587, 2001.) y en la nefropatía inducida por angiotensina II (Knier et al., J. Hypertens. 29:1602, 2011; para ver los comentarios véanse Ma *et al. Fronteras Biosci.* 14:2028, 2009 y Eddy A.A. *Thromb. Haemost.* 101:656, 2009). En contraste, los ratones que expresan en exceso PAI-1 presentan fibrosis más severa y aumento de reclutamiento de macrófagos tras la OUU (Matsuo *et al., Kidney Int.* 67: 2221, 2005; Bergheim *et al., J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:592, 2006). Se ha demostrado que el mutante de PAI-1 no inhibidor (PAI-1 R) protege a los ratones del desarrollo de fibrosis en la glomerulonefritis experimental (thy1) en rata disminuyendo la expresión de la proteína

urinaria y la acumulación de matriz glomerular (Huang *et al., Kidney Int.* 70:515, 2006). Los péptidos que bloquean PAI-1 inhiben la acumulación de colágeno 3, 4 y fibronectina en ratones OUU (González *et al., Exp. Biol. Med.* 234:1511, 2009).

El PAI-1, como diana para numerosas patologías, ha sido el foco de una investigación intensiva para inhibir su actividad o para regular su expresión durante los últimos 20 años. Se han diseñado compuestos químicos (Suzuki *et al., Expert Opin. Investig. Drugs* 20:255, 2011), anticuerpos monoclonales (Gils y Declerk, *Thromb Haemost*; 91:425, 2004), péptidos, mutantes (Cale y Lawrence, *Curr. Drug Targets* 8:971, 2007), ARNip o ARN antisentido para inhibir sus diferentes funciones o para regular su expresión. Sin embargo, a pesar de la intensa investigación, todavía queda por resolver el problema del desarrollo de un modulador terapéuticamente eficaz de PAI-1. En consecuencia, existe una necesidad en la técnica para nuevos agentes que inhiban la actividad de PAI-1 para su uso en el tratamiento de patologías humanas mediadas por PAI-1.

Compendio de la descripción

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 34), la CDR2 (SEQ TD NO: 33), y la CDR3 (SEQ ID NO: 32) del SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 37), la CDR2 (SEQ ID NO: 36), y la CDR3 (SEQ ID NO: 35) del SEQ ID NO: 7. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 6, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 7, En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% , o 90% al SEQ ID NO: 6, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 7. Todas las aproximaciones al % de identidad indican el % de identidad mínima; también están incluidos en la descripción los % de identidad más altos que los valores citados.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEC ID NO: 33, y una región

CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR de cadena ligera 3 que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 36, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 35. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 6, y la cadena ligera del anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 7.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 22), la CDR2 (SEQ ID NO: 21), y la CDR3 (SEQ ID NO: 20) del SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 25), la CDR2 (SEQ ID NO: 24), y la CDR3 (SEQ ID NO: 23) del SEQ ID NO: 3. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 2, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 3. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 2, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 3.

En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 22, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEC ID NO: 21, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 20; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 24, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 23. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 26, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 28), la CDR2 (SEQ ID NO: 27), y la CDR3 (SEQ ID NO: 26) del SEQ ID NO: 4, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 31), la CDR2 (SEQ ID NO: 30), y la CDR3 (SEQ ID NO: 29) del SEQ ID NO: 5. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 4, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 5. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 4, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 5.

En un aspecto adicional se describe en la presente memoria es un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a.) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 28, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 27, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 26; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 31, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 30, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 29, En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 4, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano de Tipo-1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 40), la CDR2 (SEQ ID NO: 39), y la CDR3 (SEQ ID NO: 38) del SEQ ID NO: 8, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 43), la CDR2 (SEQ ID NO: 42), y la CDR3 (SEQ ID NO: 41) del SEQ ID NO: 9. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de

cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 8, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 9. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 8, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEC ID NO: 9.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 40, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 39, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 38; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 43, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 42, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 41. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 8, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 9.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 52), la CDR2 (SEQ ID NO: 51), y la CDR3 (SEQ ID NO: 50) del SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 55), la CDR2 (SEQ ID NO: 54), y la CDR3 (SEQ ID NO: 53) del SEQ ID NO: 11. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 10, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 11. En un aspecto adicional de la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 10, y la luz región variable de cadena es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 11.

En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEC ID NO: 51, y una

región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 50; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 55, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 54, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 53. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 10, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 11.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano de tipo-1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 58), la CDR2 (SEQ ID NO: 57), y la CDR3 (SEQ ID NO: 56) del SEQ ID NO: 12, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 61), la CDR2 (SEQ ID NO: 60), y la CDR3 (SEQ ID NO: 59) del SEQ ID NO: 13. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 12, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 13. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 12, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEC ID NO: 13.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 58, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 57, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 56; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 61, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 60, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 59. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 12, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 13.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 64), la CDR2 (SEQ ID NO: 63), y la CDR3 (SEQ ID NO: 62) del SEQ ID NO: 14, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 67), la CDR2 (SEQ ID NO: 66), y la CDR3 (SEQ ID NO: 65) del SEQ ID NO: 15. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 14, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 15, en un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 14, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEC ID NO: 15.

En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 64, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEC ID NO: 63, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 62; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 67, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 66, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 65. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 14, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 70), la CDR2 (SEQ ID NO: 69), y la CDR3 (SEQ ID NO: 68) del SEQ ID NO: 16, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 73), la CDR2 (SEQ ID NO: 72), y la CDR3 (SEQ ID NO: 71) del SEQ ID NO: 17.

En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de

cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 16, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 17. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 16, y la región variable de cadena ligera es 99%, 98%, 97% , 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% idéntica al SEQ ID NO: 17.

En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 70, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEC ID NO: 69, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 68; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 73, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 72, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 71, en ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 16, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 17.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno humano tipo I (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 46), la CDR2 (SEQ ID NO: 45), y la CDR3 (SEQ ID NO: 44) del SEQ ID NO: 80, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 49), la CDR2 (SEQ ID NO: 48), y la CDR3 (SEQ ID NO: 47) del SEQ ID NO: 81.

En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 80, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 81. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 80, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97 %, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 83.

En un aspecto, la presente memoria describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 46, una

región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEC ID NO: 45, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 44; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 48, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 47. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 80, y la cadena ligera de anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 81.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno tipo 1 (PAI-1), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada la CDR1 (SEQ ID NO: 76), la CDR2 (SEQ ID NO: 75), y la CDR3 (SEQ ID NO: 74) del SEQ ID NO: 18, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera la CDR1 (SEQ ID NO: 79), la CDR2 (SEQ ID NO: 78), y la CDR3 (SEQ ID NO: 77) de el SEQ ID NO: 19. En un aspecto adicional la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 18, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 19. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 18, y la región variable de cadena ligera es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% al SEQ ID NO: 19.

Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 76, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 75, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 74; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 79, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 78, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 77. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 18, y la cadena ligera del anticuerpo comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 19.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 146, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 147, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y (b) regiones marco de cadena ligera, un región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 36, y una región de cadena ligera CDR3 que comprende el SEQ ID NO: 35.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 347, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 146, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 34,

una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une a esencialmente el mismo epítopo en PAI-1 que un anticuerpo monoclonal aislado, que comprende una región variable cadena pesada, donde la región variable de cadena pesada comprende CDR1 (SEQ ID NO: 34), CDR2 (SEQ ID NO: 33), y CDR3 (SEQ ID NO: 32) del SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera comprende la CDR1 (SEQ ID NO: 37), la CDR2 (SEQ ID NO: 36), y la CDR3 (SEQ ID NO: 35) del SEQ ID NO: 7.

En un cierto aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 76, región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 75, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 74; y (b) regiones marco de cadena ligera, un región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 79, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 78, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 77.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a PAI-1 humano, en donde el anticuerpo comprende: (a) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 82, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (b) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 83, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 92, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (c) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 84, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (d) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que

tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma: (e) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (f) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 94, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (g) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 87, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (h) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 88, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 96, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (i) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 97, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (j) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 90, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 98, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (k) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (l) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (m) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; o (n) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que

tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión antígeno de la misma. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada humanizada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a cualquiera de las regiones variables de cadena pesada humanas descritas previamente, y la región variable de cadena ligera humanizada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a cualquiera de las regiones variables de cadena ligera humanas descritas previamente.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 que comprende: (a) una región marco de cadena pesada y una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, y (b) una región marco de cadena ligera y una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93. En ciertos aspectos, la cadena pesada monocional aislada comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 86, y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal aislado comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95 %, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a las regiones marco del SEQ ID NO: 93. En otros aspectos, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal aislado comprende regiones marco de cadena pesada que son idénticos en 95% a las regiones marco de cadena pesada del SEQ ID NO: 86, y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal aislado comprende regiones marco de cadena ligera que son idénticas en 95% a las regiones marco del SEQ ID NO: 93.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a PAI-1 humano, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 154, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 153, o un fragmento de unión a antígeno de la misma. En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a PAI-1 humano, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 155, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 153, o un fragmento de unión a antígeno de la misma. En un aspecto adicional, la región variable de cadena pesada humanizada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a cualquiera de las regiones variables de cadena pesada humanas descritas previamente, y

la región variable de cadena ligera humanizada es idéntica en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a cualquiera de las regiones variables de cadena ligera humana descritas previamente.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, en donde el anticuerpo se une a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 158. En otra realización, el anticuerpo monoclonal aislado se une a un fragmento de un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 158. En otra realización más, el anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAL-1 se une a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 156 y/o el SEQ ID NO: 158. En otra realización, el anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 se une a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 156, el SEQ ID NO: 158, y/o el SEQ ID NO: 157. En otra realización adicional, el anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 comprende afinidad de unión específica para los residuos 160, 262, 296-297, 300-307, y/o 310-316 del SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado descrito en la presente memoria interactúa con al menos los residuos 311, 312, y 313 D-Q-E) del SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el PAI-1 unido por el anticuerpo es PAI-1 humano. En otras realizaciones, el PAI-1 unido por el anticuerpo es la forma activa del PAI-1 humano.

En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 descrito en la presente memoria se une a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 161. En otras realizaciones más, el anticuerpo monoclonal aislado se une a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 159 y/o el SEQ ID NO: 161. En otras realizaciones más, el anticuerpo monoclonal aislado se une a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 159, el SEQ ID NO: 160, y/o el SEQ ID NO: 161. En otra realización más, el anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 comprende afinidad de unión específica para los residuos 44-64 y/o residuos desde 307-321 de cyno-PAI-1 (SEQ ID NO: 162). En ciertas realizaciones, el PAI-1 unido por el anticuerpo es cyno-PAI-1. En otras realizaciones, el PAI-1 unido por el anticuerpo es la forma latente de cyno-PAI-1.

En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que inhibe competitivamente la unión de cualquiera de los anticuerpos descritos a PAI-1. En una realización, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que compite por la unión y/o inhibe competitivamente la unión con cualquiera de los anticuerpos monoclonales aislados descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado compite o inhibe

competitivamente la unión a PAI-1 humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado compite o inhibe competitivamente la unión a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 156, el SEQ ID NO: 157, y/o el SEQ ID NO: 158. En otra realización, el anticuerpo monoclonal aislado compite o inhibe competitivamente la unión a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 159, el SEQ ID NO: 160, y/o el SEQ ID NO: 161. En una realización, el anticuerpo aislado compite por la unión a un polipéptido que comprende el SEQ ID NO: 156, 157, y/o 158 con un anticuerpo monoclonal aislado que comprende (a) regiones marco de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 32; y (b) regiones marco de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 345, y una región CDR3 cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

En otro aspecto, se describen en la presente memoria nucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos monoclonales aislados descritos en la presente memoria.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método de tratamiento de una afección causada por un aumento de expresión de PAI-1 o aumento de la sensibilidad a PAI-1 que comprende administrar a un paciente u otro sujeto por vía oral, por vía parenteral una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método de restauración de la generación de plasmina que comprende administrar a un paciente u otro sujeto que lo necesite por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1. La administración parenteral descrita en la presente memoria incluye intravenosa, goteo, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o formas vaginal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, e intramuscular de administración parenteral. En algunas realizaciones, la administración a un paciente u otro sujeto comprende múltiples administraciones. En otro aspecto, el método de restauración de la generación de plasmina facilita el tratamiento terapéutico de una afección que comprende aumento de los niveles de tejido fibrótico, en algunos aspectos, la afección se caracteriza por fibrosis. En algunos aspectos, la afección es fibrosis, fibrosis cutánea, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial, y enfermedad pulmonar crónica. En otros aspectos, la generación de plasmina

facilita el tratamiento terapéutico de la fibrosis hepática, la fibrosis renal, incluyendo enfermedad renal crónica, trombosis, venosa y trombosis arterial, trombosis venosa profunda, isquemia de la extremidad periférica, trombosis por coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis, o reestenosis del dispositivo intraluminal.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por un aumento de la expresión de PAI-1 o una aumento de la sensibilidad a PAI-1 que comprende la administración a un paciente u otro sujeto por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica.

En un aspecto, el medicamento es para el tratamiento de una afección que comprende aumento de los niveles de tejido fibrótico. En algunos aspectos, la afección se caracteriza por fibrosis, en algunos aspectos, la afección es la fibrosis, fibrosis de la piel, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial, y la enfermedad pulmonar crónica. En otros aspectos, el medicamento es para el tratamiento de una afección que comprende fibrosis hepática, fibrosis renal, incluyendo enfermedad renal crónica, trombosis, trombosis venosa y arterial, trombosis venosa profunda, isquemia de la extremidad periférica, trombosis por coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis, o reestenosis del dispositivo intraluminal.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, en donde el anticuerpo inhibe la fibrosis pulmonar. En ciertas realizaciones, el anticuerpo inhibe la fibrosis en el pulmón de un sujeto. En ciertas realizaciones, el anticuerpo inhibe la fibrosis en el pulmón de un sujeto con fibrosis pulmonar idiopática (FPI). En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado descrito en la presente memoria induce un aumento en la degradación de la fibrina en un sujeto. En ciertas realizaciones, el anticuerpo aumenta la degradación de la fibrina en el plasma del sujeto. En algunas otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado descrito en la presente memoria inhibe la acumulación de colágeno en el pulmón de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene FPI. En algunas otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado descrito en la presente memoria aumenta los niveles de dímero D en el fluido de lavado broncoalveolar (FLBA) de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene FPI. En algunas otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado descrito en la presente memoria se une específicamente a PAI-1, en

donde el anticuerpo inhibe el aumento de peso del pulmón debido a la fibrosis en un sujeto. En una realización, el sujeto tiene FPI.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por un aumento de expresión de PAI-1 o aumento de la sensibilidad a PAI-1 que comprende la administración a un paciente por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica, en donde la afección es la fibrosis pulmonar idiopática.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método de restauración de la generación de plasmina que comprende la administración a un paciente u otro sujeto por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1, en donde la generación de plasmina facilita el tratamiento terapéutico de la fibrosis pulmonar idiopática,

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, en donde el anticuerpo restaura la actividad fibrinolítica en un sujeto. En ciertas realizaciones, el anticuerpo restaura la actividad fibrinolítica en un sujeto con accidente cerebrovascular isquémico agudo. El accidente cerebrovascular isquémico agudo puede ser con o sin trombolisis. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado restaura la lisis de coágulos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo restaura en la lisis de coágulos in vitro. En otras realizaciones más, el anticuerpo restaura en la lisis de coágulos in vitro con una CI_{50} de aproximadamente 2 nM.

En otros aspectos, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, donde el anticuerpo restaura la rotura de fibrina en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene accidente cerebrovascular isquémico agudo.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por un aumento de expresión de PAI-1 o aumento de la sensibilidad a PAI-1 que comprende la administración a un paciente por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica, en donde la afección es el accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método de restauración

de la generación de plasmina que comprende la administración a un paciente u otro sujeto que lo necesite por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo PAÏ- 1, en donde la generación plasmina facilita el tratamiento terapéutico del ictus isquémico agudo con y sin trombolisis.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, donde el anticuerpo inhibe la formación de adherencias en un sujeto. En algunas realizaciones, la formación de adherencias es después de cirugía o lesión en el sujeto. En algunas realizaciones, la formación de adherencias en el sujeto es abdominal. En otras realizaciones, la formación de adherencias se produce en el hombro, la pelvis, el corazón, la columna vertebral, la mano, y otras regiones del cuerpo del sujeto.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección causada por un aumento de expresión de PAI-1 o un aumento de sensibilidad a PAI-1 que comprende la administración a un paciente por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica, en donde la afección es la formación de adherencias abdominales.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para restaurar la generación de plasmina que comprende la administración a un paciente u otro sujeto que lo necesite por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1, en donde la generación de plasmina facilita el tratamiento terapéutico o la prevención de la formación de adherencias. En algunas realizaciones, la formación de adherencias en el sujeto es abdominal.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un complejo de PAI-1/vitronectina. En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que neutraliza la actividad de PAI-1 mediante la inducción de conformación de sustrato de PAI-1. En una realización, el anticuerpo restaura o es capaz de restaurar la generación de plasmina. En otra realización, el anticuerpo monoclonal aislado induce o es capaz de inducir la degradación de fibronectina. En otra realización más, el anticuerpo monoclonal aislado induce o es capaz de inducir la activación de metaloproteinasas de la matriz (MMP).

En otro aspecto, el anticuerpo monoclonal aislado descrito en la presente memoria

es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo Fv de cadena sencilla. En otras realizaciones, la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas por un conector flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo Fab, Fab', o $(Fab')_2$.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo cristalizado. En una realización, se describe en la presente memoria un cristal aislado que comprende el fragmento Fab' del anticuerpo monoclonal A44, en donde el fragmento Fab' consiste en la secuencia de cadena ligera del SEQ ID NO: 7 y la secuencia de cadena pesada del SEQ ID NO: 6. En otra realización, se describe en la presente memoria un cristal aislado que comprende un fragmento Fab' que comprende una secuencia de cadena ligera del SEQ ID NO: 93 y una secuencia de cadena pesada del SEQ ID NO: 86. En una realización, el cristal aislado comprende dimensiones de la celda unidad asimétrica a = 105 Å , b = 52 Å y c = 298 Å. En una realización, el cristal aislado pertenece al grupo espacial P212121. En otra realización, el cristal aislado comprende una resolución de 3,3 Å de difracción de rayos x. En una realización, el cristal aislado conserva la actividad biológica del anticuerpo cristalizado. En algunas realizaciones, el cristal aislado tiene una mayor vida media in vivo que la contraparte soluble del anticuerpo cristalizado.

En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende: (a) el anticuerpo cristalizado que se une específicamente a PAI-1 y (b) al menos un excipiente farmacéutico que incorpora o encapsula el cristal. En otro aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria,

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para generar un anticuerpo contra PAI-1 que comprende la inmunización de un mamífero con un complejo compuesto de PAI-1, o un fragmento del mismo, y vitronectina.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método de selección de un anticuerpo contra PAI-1 en un ELISA por su capacidad para bloquear la función de PAI-1 como inhibidor de la actividad de tPA, que comprende las etapas de: (a) unir PAI-1 a una placa de ELISA; (b) incubar la placa de ELISA con el anticuerpo contra PAI-1; (c) incubar la placa ELISA con tPA; (d) incubar la placa de ELISA con anticuerpo anti-tPA marcado; y (e) medir la DO_{405} emitida por el anticuerpo anti-tPA marcado; en donde una lectura positiva indica que el anticuerpo contra PAI-1 se une a PAI-1, pero no bloquea la

formación del enlace covalente entre PAI-1 y tPA, y una lectura negativa indica que el anticuerpo contra PAI-1 bloquea la interacción de tPA con PAI-1.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método de escrutinio de hibridomas. En ciertas realizaciones, el método de escrutinio comprende un método de escrutinio inverso utilizando anticuerpos anti-PAI-1 inmovilizados anti-ratón. En otras realizaciones, el método de escrutinio comprende o un análisis de escrutinio directo utilizando PAI-1 libre como un ligando o contra vitronectina inmovilizada. En ciertas realizaciones, el método se aplica para determinar la afinidad de un anticuerpo por un complejo de PAI-1/vitronectina. En algunas realizaciones, el método comprende: inmovilizar vitronectina en una superficie; poner en contacto PAI-1 con la vitronectina inmovilizada en la superficie, formando de esta manera un complejo; poner en contacto la superficie que comprende el complejo con el anticuerpo; separar el anticuerpo unido al complejo del anticuerpo no unido; detectar el anticuerpo unido al complejo, y analizar los niveles de anticuerpo unido al complejo para determinar la afinidad del anticuerpo por el complejo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra una representación esquemática de los mecanismos entre PAI-1 y las serina proteasas del activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA) y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). El PAI-1 muestra flexibilidad estructural y puede aparecer en una conformación latente o una conformación activa cuando se une a la vitronectina (Vn). La región RCL de PAI-1 porta el enlace peptídico cebo (también denominado P1-P1') que es el sitio de escisión por la serina proteasa. Se forma primero un complejo de Michaelis con tPA o uPA, a continuación, la tríada catalítica reacciona con el enlace peptídico cebo para formar un complejo de enzima acilada que, después de la escisión del enlace peptídico P1-P1', induce fuertes cambios de conformación. La enzima acilada es un complejo lábil formado por enlace covalente entre el residuo de serina (triángulo de color negro) de la tríada catalítica de la serina proteasa (tPA) y el aminoácido del sustrato (círculo de color negro) que experimenta hidrólisis adicional. Los cambios conformacionales causan la inserción de la RCL escindida en una hebra β manteniendo la proteasa unida covalentemente como una enzima acilada con PAI-1. Bajo circunstancias no fisiológicas, la hidrólisis de este complejo de enzima acilada puede inducir la liberación del PAI-1 escindido y libre de proteasa activa.

La **Figura 2** representa una curva estándar típica para la titulación de anticuerpos en el ELISA de unión como se describe en el Ejemplo 2. Los anticuerpos 31C9, 33B8 y

33H1 fueron controles positivos y la IgG1 fue un control negativo.

La **Figura 3** representa una curva de representación para un ELISA funcional para seleccionar anticuerpos que bloquean la interacción de PAI-1 con tPA como se describe en el Ejemplo 4. El anticuerpo 33H1 es un control positivo, IgGl es un control negativo y A44 se identificó como un clon de anticuerpo positivo.

La **Figura 4** representa la neutralización de la actividad de bloqueo de PAI-1 humano de tPA por A44 y anticuerpos disponibles comercialmente (33B8 y 33H1) en el análisis cromogénico descrito en el Ejemplo 4.

La **Figura 5** representa la neutralización de la actividad de bloqueo de PAI-1 humano de tPA por una selección de anticuerpos producidos a partir de diferentes fusiones (véase el Ejemplo 4).

La **Figura 6** representa PAI-1 humano y sus ortólogos bloquean la actividad tPA humana en análisis cromogénico con la potencia similar.

La **Figura 7** representa la neutralización de la actividad de bloqueo de PAI-1 de cinomolgo (cyno) y ratón de tPA humano por anticuerpos A44 y 33B8 (disponibles comercialmente) en el análisis cromogénico descrito en el Ejemplo 4.

La **Figura 8** representa el análisis de SDS-PAGE de los mecanismos de acción de los anticuerpos 33H8 (convierte PAI-1 de confirmación activa a latente), 33H1 (convierte PAI-1 de conformación activa a sustrato) y A44 para bloquear la interacción de PAI-1 con tPA. Calle 1: patrones de peso molecular; Calle 2: solamente PAI-1; Calle 3: solamente tPA; Calle 4: PAI-1 en presencia o tPA; Calle 5: 33B8 + PAI-1 + tPA; Calle 6: 33H1 + PAI-1 + tPA; Calle 7: A44 + PAI-1 + tPA; Calle 8: mAb es un anticuerpo de control de isotipo.

La **Figura 9** representa el análisis de SDS-PAGE de los mecanismos de acción para los anticuerpos 33H8 (convierte PAI-1 de confirmación activa a latente), 33H1 (convierte PAI-1 de conformación activa a sustrato) y anticuerpos desarrollados a partir de fusiones C26, E16 y E21 para bloquear la interacción de PAI-1 con tPA. Calle 1: patrones de peso molecular; Calle 2: solamente PAI-1; Calle 3: solamente tPA; Calle 4: PAI-1 en presencia de tPA; Calle 5: 33B8 + PAI-1 + tPA; Calle 6: 33H1 + PAI-1 + tPA; Calle 7: C26 + PAI-1 + tPA; Calle 8: E16 + + PAI-1 + tPA; Calle 9: E21 + PAI-1 + tPA; Calle 10: mAb es un anticuerpo de control de isotipo.

La **Figura 10** representa el análisis de SDS-PAGE de los mecanismos de acción de los anticuerpos 33H8 (convierte PAI-1 de conformación activa a latente), 33H1 (convierte PAI-1 de conformación activa a sustrato) y anticuerpos desarrollados a partir de fusiones de A39, B109 y C45 para bloquear la interacción de PAI-1 con tPA, Calle 1: patrones de peso molecular; Calle 2: solamente PAI-1; Calle 3: solamente tPA; Calle 4:

PAI-1 en presencia de tPA; Calle 5: 33B8 + PAI-1 + tPA; Calle 6: 33H1 + PAI-1 + tPA; Calle 7: A39 + PAI-1 + tPA; Calle 8: B109 + PAI-1 + tPA; Calle 9: C45 + PAI-1 + tPA; Calle 10: mAb es un anticuerpo de control de isotipo.

La **Figura 11** representa el alineamiento de la cadena ligera de los siguientes anticuerpos murinos: A105 (SEQ ID NO: 3), A39 (SEQ ID NO: 5), A44 (SEQ ID NO: 7), A71 (SEQ ID NO: 9) , A75 (SEQ ID NO: 81), B109 (SEQ ID NO: 11), B28 (SEQ ID NO: 13), C45 (SEQ ID NO: 15), E16 (SEQ ID NO: 17) y E21 (SEQ ID NO: 19). Las CDR se resaltan en negrita.

La **Figura 12** representa el alineamiento de la cadena pesada de los siguientes anticuerpos murinos: A 105 (SEQ ID NO: 2), A39 (SEQ ID NO: 4), A44 (SEQ ID NO: 6), A71 (SEQ ID NO: 8), A75 (SEQ ID NO: 80), B109 (SEQ ID NO: 10), B28 (SEQ ID NO: 12), C45 (SEQ ID NO: 14), E16 (SEQ ID NO: 6), y E21 (SEQ ID NO: 18). Las CDR, según se ha definido por IMGT, se resaltan en negrita.

La **Figura 13** representa el alineamiento de la cadena ligera de A44 murino (SEQ ID NO: 7) con vk1 (SEQ ID NO: 101) y vlambda3 (SEQ ID NO: 102).

La **Figura 14** representa el alineamiento de la cadena pesada de A44 murino (SEQ ID NO: 6) con vh2 (SEQ ID NO: 103) y vh4 (SEQ ID NO: 104).

La **Figura 15** representa la humanización de VL del clon A44 con todos los constructos alineados. Todas las secuencias alineadas (SEQ ID NO: 91-98) se describen más adelante en la Tabla 25. Los recuadros de color negro representan dominios de CDR. La secuencia de los residuos destacados varía desde el residuo directamente por encima del alineamiento. La numeración de los residuos es la descrita por IMGT.

La **Figura 16** representa la humanización de VH del clon A44 con todas los constructos alineados. Todas las secuencias alineadas (SEQ ID NO: 82-90) se describen más adelante en la Tabla 25. Los recuadros de color negro representan dominios de CDR. La secuencia de los residuos destacados varía desde el residuo directamente por encima del alineamiento. La numeración de los residuos es la descrita por IMGT.

La **Figura 17** representa el porcentaje de inhibición de la actividad de PAI-1 que se representa como una función de la concentración de mAb y se determinaron CI50 e Imax utilizando el soporte lógico de velocidad Biostat.

La **Figura 18** representa la purificación por homogeneidad de Fab A44 recombinante etiquetado con 6-His.

La **Figura 19** representa el análisis SPR con Biacore 2000 utilizando solo el análisis cinético de la unión de PAI-1 humano glicosilado a un anticuerpo APG inmovilizado. Un sensograma de cinética de un solo ciclo se muestra en color gris. El

modelo de ajuste se muestra en color negro.

La **Figura 20** representa la neutralización de PAI-1 en plasma humano por anticuerpos APG, APGv2, y APGv4 según se determinó por la detección de la formación de complejos de UK-Pal-1 mediante ELISA. El porcentaje de inhibición de la actividad de PAI-1 se representó gráficamente como una función de la concentración de anticuerpos APG, APGv2, o APGv4.

La **Figura 21** representa restauración de la lisis de coágulos de plasma humano por A44V11 (1, 3 o 10 nM) en presencia de tPA 1 nM y PAI-1 3 nM como se detecta por medición cinética de turbidimetría mediante lectura de absorbancia a 340 nm como una función del tiempo (min).

La **Figura 22** representa ausencia de restauración de la lisis de coágulos de plasma humano por control negativo IgG1 humana (1, 3 o 10 nM) en presencia de tPA 1 nM y PAI-1 3 nM como se detecta por absorbancia a 340 nm como una función del tiempo (min).

La **Figura 23** representa la restauración de la lisis de coágulos de plasma humano por A44V11 o control negativo de isotipo de IgGl humana a diversas concentraciones.

La **Figura 24** representa la restauración de la lisis de coágulos de plasma humano por APG, APGV2 o APGV4 a 3 nM en presencia de tPA 1 nM y PAI-1 3 nM como se detecta mediante absorbancia a 340 nm como una función del tiempo (min).

La **Figura 25** representa la restauración de la lisis de coágulos de plasma humano por la variante 2 y 4 de APG a diversas concentraciones.

La **Figura 26** representa anti-PAI-1 de inmunotransferencia en sobrenadantes de miofibroblastos LL29 humanos 48H después del tratamiento mediante A44V11 o mAb de control de isotipo IgG a 50 nM y 5 ng/ml de TGPβ.

La **Figura 27** representa la actividad genérica de MMP en fibroblastos de pulmón primarios humanos después del tratamiento de células durante 48hr con PBS (control), plasminógeno (Pg), A44v11 y plasminógeno (A + Pg) o IgG humana negativa y plasminógeno (Neg + Pg).

La **Figura 28** representa nivel PAI-1 activo humano en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) (A) y en el producto lisado de pulmón (B) de ratones tratados con bleomicina el día 7 y el día 9 después del tratamiento el día 4 con A44 o IgG1 a 10 mg/kg o PBS mediante administración ip. El PAI-1 activo se determinó mediante ELISA (# HPAIKT Molecular Innovation). El porcentaje de inhibición se calculó dividiendo la diferencia entre A44 bleo e IgG bleo por la diferencia entre el grupo de ratones IgG bleo y no tratados (PBS).

La **Figura 29** representa nivel de Dímero D en ratón en BALF de ratones tratados con bleomicina el día 7 y el día 9 siguientes al tratamiento el día 4 con A44 o IgGl a 10 mg/kg o PBS mediante administración i.p., según se determinó mediante ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago). Se indica la multiplicidad de aumento de dímero D inducida por A44 en comparación con IgG.

La **Figura 30** representa el peso del pulmón derecho de ratones transgénicos humanizados 21 días después del tratamiento con solución salina o bleomicina seguido de administración i.p. de 10 mg/kg de PBS (vehículo), IgGl o A44, del día 4 al día 20 cada 3 días.

La **Figura 31** representa el contenido en pulmón de hidroxiprolina en ratones transgénicos humanizados 21 días después del tratamiento con solución salina o bleomicina seguido administración i.p. de 10 mg/kg de PBS (vehículo), IgG1 o A44 desde el día 4 al día 20 cada 3 días.

La **Figura 32** representa el nivel de PAI-1 activo en plasma de monos tratados mediante A4411 (A) mAb (n = 5) o con control de isotipo de IgG1 (B) (n = 4) (5 mg kg ip) 24 horas antes de la sensibilización con LPS (100 ug/kg iv). Las muestras de sangre se recogieron en el punto temporal indicado y se determinaron los niveles de PAI-1 activo en plasma utilizando el ELISA (# HPAIKT de Molecular Innovation).

La **Figura 33** representa el nivel de PAI-1 activo en biopsia de hígado de monos tratados mediante A44V11 (A) mAb (n = 5) o con control de isotipo de IgG1 (B) (n = 4) (5 mg/kg ip) 24 horas antes de la estimulación con LPS (100 ug/kg iv). Las biopsias de hígado se recogieron en monos anestesiados en el punto temporal indicado y se determinaron los niveles PAI-1 activo en los productos lisados utilizando el ELISA (# HPAIKT de Molecular Innovation).

La **Figura 34** representa el nivel de dímero D en el plasma de monos tratados mediante A44V11 (A) mAb (n ~ 5) o con control de isotipo de IgG1 (B) (n = 4) (5 mg/kg ip) 24 horas antes de la estimulación con LPS (100 ug/kg iv). Las muestras de sangre se recogieron en el punto temporal indicado y se determinaron los niveles de dímero D en plasma utilizando el ELISA.

La **Figura 35** representa el nivel de complejos de plasmina-α2 antiplasmina (PAP) en el plasma de monos tratados mediante A44V1 1 (A) mAb (n-5) o con control de isotipo de IgG1 (B) (n =) (5 mg/kg ip) 24 horas antes de la estimulación con LPS (100 ug/kg iv). Las muestras de sangre se recogieron en el punto temporal indicado y se determinaron los niveles de PAP en plasma utilizando el ELISA (# Asserachrom PAP de Diagnostica Stago).

La **Figura 36** representa el nivel de PAI-1 activo en líquido intraperitoneal (IPF) y productos lisados de cuerno uterino. Niveles de PAI-1 activo en el fluido intraperitoneal (A) y productos lisados de cuerno uterino (B). En los puntos temporales de 6 horas y el día 7 los niveles de PAI-1 activo fueron más bajos tanto en el líquido intraperitoneal (IFF) como en el producto lisado de cuerno uterino (UH) en los animales tratados con anticuerpo A44V11 en comparación con los animales tratados con anticuerpo de control de isotipo, no se observó diferencia en el punto temporal de 72 horas. (* p <0,001 calculado por la prueba t de Student)

La **Figura 37** representa otro ejemplo de purificación por homogeneidad de Fab A44 etiquetado con 6-His recombinante.

La **Figura 38** representa la purificación por homogeneidad Fab A44 etiquetado con 6-His recombinante complejado con la proteína PAL-1 wt humana.

La **Figura 39** (a) representa el complejo de cristalización del complejo Fab A44/PAI-1, y la Figura 39 (b) representa los cristales mejor optimizados.

La **Figura 40** representa los cristales individuales del complejo Fab A44/PAI-1 en forma de varilla.

La **Figura 41** representa el reconocimiento por Fab A44 de la forma activa de PAI-1 humano y la forma latente de PAI-1 cyno.

La **Figura 42** representa el epítopo de PAI-1 reconocido por Fab A44 en (A) PAL-1 humano activo, y (B) PAI-1 cyno latente.

La **Figura 43** representa el parátopo de la cadena pesada del complejo Fab A44/PAI-1.

La **Figura 44** muestra el parátopo de la cadena ligera del complejo Fab A44/PAI-1.

La **Figura 45** representa un alineamiento de secuencia de los epítopos de unión de A44 propuestos de PAI-1 de cyno, ser humano, rata y ratón. Las secuencias se extrajeron del SEQ ID NO: 1 (PAI-1 humano), SEQ ID NO: 162 (PAI-1 de cyno), SEQ ID NO: 163 (PAI-1 de ratón), y SEQ ID NO: 164 (PAI-1 de rata).

La **Figura 46** representa la comparación de la estructura de PAI-1 de ratón con la estructura del complejo de PAI-1 humano/A44V11.

La **Figura 47** muestra la estructura del complejo de PAI-1 humano/A44V11 y el modelo de unión de vibronectina a PAI-1.

La **Figura 48** representa la cobertura de péptido péptico de cyno-PAI-1 (SEQ ID NO: 162); se obtiene 95,3% de cobertura de secuencia a partir de 150 péptidos pépticos solapantes.

La **Figura 49** representa gráficos de captación de deuterio representativos para

péptidos cyno-PAI-1 en los estados no unido (líneas de círculos), unido a APGv2 (líneas de x) y unido a A44v11 (líneas de diamantes). Los rangos de residuos/posiciones son del SEQ ID NO: 162. (A) la mayoría de los péptidos pépticos no mostró diferencias entre cyno-PAI-1 solo o unido a cualquier mAb. (B), los péptidos que cubren los residuos 44-64 mostraron una protección similar del intercambio en ambos estados unidos a mAb. (C), los péptidos que incorporan los residuos 295-322 incorporan menos deuterio en ambos estados unidos a mAb, sin embargo, la magnitud de la protección es mayor para A44v11.

La **Figura 50** representa la comparación del intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX) de cyno-PAI-1 solo y unido a A44v11. (A), el gráfico de mariposa del intercambio fraccional relativo medio con el estado no unido anterior y el estado ligado siguiente. Las líneas corresponden a los datos adquiridos para los puntos temporales de 10 seg, 1 min, 5 min, y 240 min. En (B), gráfico de los datos de diferencia (en daltons) del gráfico anterior en (A) para cyno-PAI-1 solo o unido a A44v11.

La **Figura 51** muestra la comparación de HDX de cyno-PAI-1 solo y unido a APGv2. En (A), gráfico mariposa de intercambio fraccional relativo medio con el estado no unido anterior y el estado ligado siguiente. Las líneas corresponden a los datos adquiridos durante los puntos temporales de 10 seg, 1 min, 5 min y 240 min, en (B), gráfico de los datos de diferencia del panel (A) anterior para cyno-PAI-1 solo o unido a APGv2.

La **Figura 52** representa la comparación de HDX de cyno-PAI-1 unido a A44v11 y unido a APGv2. en (A), gráfico de mariposa del intercambio fraccional relativo medio con el estado unido a APGv2 anterior y el estado unido a A44v11 siguiente. Las líneas corresponden a los datos adquiridos para los puntos temporales de 10 seg, 1 min, 5 min y 240 min. En (B), gráfico de los datos de diferencia del panel (A) anterior para cyno-PAI-1 unido a APGv2 o A44v11.

La **Figura 53** muestra el epítopo cyno-PAI-1:A44v11 determinado mediante HDX MS. Los residuos de cynoPAI-1 (SEC ID NO: 162) que muestran la protección del intercambio en el estado unido a anticuerpo A44v11 se muestran en negrita. Los residuos del epítopo cyno-PAI-1:A44v11 determinados a partir de los estudios de cristalización se muestran en recuadros.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen específicamente a PAI-1 humano y modulan las funciones biológicas de PAI-1. Tales anticuerpos son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a PAI-1 (p. ej., fibrosis). La invención también proporciona

composiciones farmacéuticas, así como ácidos nucleicos que codifican anticuerpos PAI-1, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para la fabricación de tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos. Los métodos de uso de los anticuerpos descritos en la presente memoria para detectar PAI-1 o para modular la actividad de PAI-1, ya sea in vitro o in vivo, también están abarcados por la invención.

I. Definiciones

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "PAI-1 humano" se refiere a un péptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos enumerada a continuación:

VHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTGGETQQQIQ AAMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMPHFFRLFRS TVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISNLLGKGAVDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPF PDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAA PYEKEVPLSALTNILSAQLISHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFR QFQADFTSLSDQEPLHVAQALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIMDRPFLFV VRHNPTGTVLFMGQVMEP (SEQ ID NO. 1), o un fragmento de la misma.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) conectadas entre sí por puentes disulfuro, así como multímeros de las mismos (p. ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada VH o VH) y una región constante de cadena pesada (CH o CH). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada V_L o VL) y una región constante de cadena ligera (C_L o CL). La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_L1). Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son regiones marco más conservadas, denominadas (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal a carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluye cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural,

obtenibles enzimáticamente, sintéticos, o modificados genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden obtenerse, p. ej., a partir de moléculas de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales cualesquiera adecuadas, tales como la digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y opcionalmente constantes de anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de las porciones de unión a antígeno incluyen: (j) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades mínimas de reconocimiento que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (p. ej. una región determinante de complementariedad aislada (CDR)). Otras moléculas modificadas genéticamente, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, también están incluidas dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno"

Según se utiliza en la presente memoria, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat *et al., J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) y Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), y por Chothia *et al., J. Mol Biol.* 196:901-917 (1987) y por MacCallum *et al., J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996), donde las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia. La numeración IMGT única para todas las regiones V de IG y TR de todas las especies se basa en la alta conservación de la estructura de la región variable (Lefranc, Mp e*t al., Dev comp. Immunol.* 27:55-77, 2003). La numeración IMGT, creada después de alinear más de 5.000 secuencias tiene en cuenta y combina la definición del marco y las CDR. La definición de Clothia se basa en la localización de las regiones de los bucles estructurales. La definición de Contacto (MacCallum *et al.*) se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas y de las interacciones anticuerpo-antígeno. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR según se ha definido por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen para la comparación. En una realización descrita en la presente memoria, el término "CDR" es una CDR como se define por la definición de Kabat. En otra realización descrita en la presente memoria, la CDR es una CDR como se define por IMGT.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "residuos de aminoácido del

marco (FR)" se refiere a aquellos aminoácidos de la región marco de una cadena de Ig. El término "región estructural" o "región FR" según se utiliza en la presente memoria, incluye los residuos de aminoácidos que forman parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (p. ej., utilizando la definición de Contacto de las CDR). Por lo tanto, un marco de región variable tiene entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud, pero incluye solo aquellos aminoácidos fuera de las CDR.

La presente invención también abarca "sustituciones de aminoácidos conservativas" en las secuencias de aminoácidos de CDR de los anticuerpos descritos en la presente memoria, es decir, modificaciones de la secuencia de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo al antígeno, es decir, PAI-1. Una sustitución conservativa es una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo de tal manera que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, una sustitución conservativa resulta de la sustitución de un residuo no polar en un polipéptido por cualquier otro residuo no polar. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede ser sustituido por alanina, como se ha descrito anteriormente para "mutagénesis de barrido de alanina" (Cunningham *et al., Science* 244: 1081-1085 (1989)). Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido de una clase por un aminoácido de la misma clase, donde una clase es definida por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral de aminoácido y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas encontradas en la naturaleza, según se determina, por ejemplo, por una matriz de intercambio de frecuencia de Dayhoff convencional o matriz BLOSUM. Se han clasificado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met), y la clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro residuo de Clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservativa. Así, un residuo de aminoácido no esencial pronosticado en un anticuerpo PAI-1 es remplazado por otro residuo de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones de aminoácidos conservativas que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (*véase, p. ej.*, Brummell et al., *Biochem*. 32: 1180, 1993; Kobayashi *et al Protein Eng.* 12: 879, 1.999; y Burks et al. *Proc. Nat. Acad. Sci*. USA 94:412, 3997). Las reglas generales para las sustituciones de aminoácidos conservativas se exponen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Sustituciones de Aminoácidos Conservativas

Residuos Originales	Sustituciones Ilustrativas	Sustituciones Seleccionadas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucin	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las sustituciones de aminoácidos conservativas también abarcan los residuos de aminoácidos de origen no natural que se incorporan típicamente mediante síntesis peptídica química en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos, y otras formas opuestas o invertidas de residuos de aminoácidos.

Se espera que las modificaciones conservativas de la secuencia de aminoácidos (y las modificaciones correspondientes de los nucleótidos codificantes) produzcan anticuerpos-Pal-1 que tienen características funcionales y químicas similares a las de los

anticuerpos PAL-1 origen natural, en contraste, se pueden llevar a cabo modificaciones sustanciales las características funcionales o químicas de los anticuerpos PAI-1 mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo, en forma de una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o carácter hidrófobo de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades de cadena lateral comunes:

1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;
3) ácidos: Asp, Glu;
4) alcalinos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de las clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo contra PAI-1 humano que son homólogas con anticuerpo contra PAI-1 no humano, o en las regiones no homólogas de la molécula.

En ciertos aspectos, las regiones variables de cadena pesada o ligera pueden ser idénticas en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a cualquiera de las secuencias de la región variable descritas la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a un antígeno con una Kd que es inferior a 1×10^{-6} M, $1 \times 1\ 0^{-7}$ M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-l0} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M o menos. El término también abarca la referencia a la capacidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

La descripción también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítopo descrito en la presente memoria según se determina por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoanálisis descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítopo en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50%.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "antígeno" se refiere al sitio de unión o epítopo reconocido por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "vector" se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y por lo tanto se replican junto con el genoma del huésped. Por otra parte, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están conectados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente. Sin embargo, se pretende que la invención incluya tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para los fines de esta invención. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que derivan de virus animales tales como el virus del papiloma bovino, virus del polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión al ribosoma. Además, se pueden seleccionar células que han integrado el ADN en sus cromosomas introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células anfitrionas transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un anfitrión auxotrófico, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador de selección o bien puede estar directamente relacionado con las secuencias de ADN que se van a expresar, o bien se puede introducir en la misma célula por medio de co-transformación. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm, Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores de transcripción, potenciadores y señales de terminación.

En realizaciones concretas los genes de la región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de cadena pesada y ligera (p. ej., humanos) sintéticos como se comentó anteriormente.

En términos generales, una vez que se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, el vector de expresión puede ser introducido en una célula anfitriona apropiada. Es decir, las células anfitrionas pueden ser transformadas. La introducción del plásmido en la célula anfitriona puede llevarse a cabo mediante diversos mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN con envoltura, microinyección e infección con virus intactos. Véanse, Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors" Capítulo 24.2, págs. 470-472 Vectors, Rodríguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass., 1988). Una realización descrita en la presente memoria es la introducción del plásmido en el anfitrión a través del electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se analizaron para determinar la síntesis de proteínas de cadena pesada o ligera. Las técnicas de análisis ilustrativas incluyen análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), o el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "transformación" se utiliza en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula anfitriona receptora que cambia el genotipo y en consecuencia da como resultado un cambio en la célula receptora.

"Células anfitrionas" se refiere a células que han sido transformadas con vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procedimientos para el aislamiento de polipéptidos a partir de anfitriónes recombinantes, se utilizan los términos "célula" y "cultivo celular" indistintamente para designar la fuente de anticuerpo a menos que se especifique lo contrario claramente. En otras palabras, la recuperación del polipéptido a partir de las "células" puede significar cualquiera de las células completas centrifugadas, o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células en suspensión.

Se debe entender que este término tiene el objeto de referirse no solo a la célula sujeto concreta sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias

ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía incluirse dentro del alcance de la expresión "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren las medidas terapéuticas o preventivas descritas en la presente memoria. Los métodos de "tratamiento" emplean administración a un sujeto, de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descritos en la presente memoria, por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociados a PAI-1 (p. ej., una enfermedad fibrótica) o que está predispuesto a tener tal enfermedad o trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrentes, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más de los que se espera en ausencia de tal tratamiento.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad o trastorno asociados a PAI-1" incluye los estados de enfermedad con o sin síntomas asociados con un estado de enfermedad, donde se encuentran niveles o la actividad de PAI-1 alterados. Las enfermedades o trastornos asociados a PAI-1 ilustrativos incluyen diversos tipos de fibrosis.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno mismo que se une PAI-1, que es suficiente para efectuar el tratamiento, pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociados a PAI-1, como se describe la presente memoria, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de la afección del sujeto y la enfermedad que se esté tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración y similares, que puede ser fácilmente determinada por un experto normal en la técnica. Las dosificaciones para la administración pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 10.000 mg, de aproximadamente 1 ug a aproximadamente 5000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descritas en la presente memoria. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial (es decir, efectos secundarios) de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es minimizado o superado por los efectos beneficiosos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" o "mamífero" incluye

cualquier ser humano o animal no humano.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión específica de antígeno en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como parátopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a zonas diferentes en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional es uno producido por aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica,

Se observa aquí que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

II. Anticuerpos Anti-PAI-1

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a PAI-1 humano. Las secuencias de aminoácidos de VH, VL y CDR y las secuencias de nucleótidos ilustrativas de los anticuerpos descritos en la presente memoria se exponen en la Tabla 2. Las regiones CDR mostradas en la Tabla 2 se definen mediante IMGT.

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de VH, VL y CDR de anticuerpos anti-PAI-1 ilustrativos o fragmentos de los mismos

ANTI-CUERPO	SECUENCIA	SEQ ID NO
mA105 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSIYWIEWVKQRP GLGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAFMQL SSLTSEDSAVYYCARGGLYYDLDYWGQGTILTVSSAKTTPP	2
mA105 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL QRPGQSPQRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLSRV EGADLGVYYCWQDRHFPRTFGGGTKLEIKRAD	3
mA39 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQWVKQRP GHGLEWIGEILPGSNTNYNEKFKDKATFTADSSSNTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARLGIGLRGALDYWGQGTSVTVSSAKTT PP	4
mA39 VL	DIQMTHSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYHQKQGK SPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNIKSLQPEDFG TFYCQHRYGSPWTFGGGTKLEIKRAD	5
mA44 VH	EMQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSMTNGYWNWIRKF PGNKLEYMGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRNTSKNQYYLQL SSVTTEDTATYYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTLTVSSAKT TPP	6
mA44 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWLQQKPGK SPKTLIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDM GIYYCLQYDEFPPTFGGGTKLEIKRAD	7
mA71 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQRP GHGLDWIGEILPGSGNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTVYMQ LSSLTSEDSAVYYCARGGLYYNLDSWGQGTTLTVSSAKTTP P	8
mA71 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLYWLL QRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGVYYCWQDTHFPRTFGGGTKLEIKRAD	9
mA75 VH	QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIAWLKQRP GHGLEWIAEILPGSGLTNYNEIFRGKATFTADTSSNTAYMQL	80

	SSLTSEDSAVYYCARGGLYYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAP	
mA75 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASICKSSQSLLDSEGKTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVCKLDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEGEDLGVYYCWQGSHFPQTFGGGTKLEIKRAD	81
mB109 VH	EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDTTYNQKFEDKAKLTAVASASTAYMEVSSLTNEDSAVYYCTRGLRRWGAMDYWGQGTSVTVSSAKTTPP	10
mB109 VL	DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSIPCKASQDVSSAVAWYQQKLGQSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPYTFGGGTNLEIKRAD	11
mB28 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQRPGGLEWIGKILPGSGGANYNEKFKGKATVTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARLSTGTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP	12
mB28 VL	DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVYSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLQPEDFGSYYCQHHYGTPPTFGGGTKVEIKRAD	13
mC45 VH	QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPGQGLEWIGVIHPGSGVTNYNEKFKGKAILTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGTSVTVSS	14
mC45 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRTFGGGTKLEIK	15
mE16 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQTPEKGLGWVASLRTGGNTYYSDSVKGRFTISRDNDRNILYLQMSSLTSEDTAVYYCARGLRHWGYFDVWGAGTTVTVSS	16
mE16 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVSTAVGWYQQEPGQSPKLLIYSASNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPWTFGGGTKLEIK	17
mE21 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYDPKFQAKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCMYGNYPYYFDYWGQGTTLTVSS	18

mE21 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPD GTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK	19
mA105 HCDR3	ARGGLYYDLDY	20
mA105 HCDR2	ILPGSGST	21
mA105 HCDR1	GFTFSIYW	22
mA105 LCD3	WQDRHFPRT	23
mA105 mA71 LCDR2	LVS	24
mA105 mA71 LCDR1	QSLLDSDGKTY	25
mA39 HCDR3	ARLGIGLRGALDY	26
mA39 HCDR2	ILPGSNT	27
mA39 HCDR1	GYTFNIYW	28
mA39 LCDR3	QHRYGSPWT	29
mA39 LCDR2	NAK	30
mA39 LCDR1	ENIYSY	31
mA44 HCDR3	ARWHYGSPYYFDY	32
mA44 HCDR2	ITYSGST	33
mA44	GDSMTNGY	34

HCDR1		
mA44 LCDR3	LQYDEFPPT	35
mA44 LCDR2	RAN	36
mA44 LCDR1	QDINSY	37
mA71 HCDR3	ARGGLYYNLDS	38
mA71 HCDR2	ILPGSGNT	39
mA71 HCDR1	GFTFSTYW	40
mA71 LCDR3	WQDTHFPRT	41
mA71 LCDR2	LVS	42
mA71 LCDR1	QSLLDSDGKTY	43
mA75 HCDR3	ARGGLYYAMDY	44
mA75 HCDR2	ILPGSGLT	45
mA75 HCDR1	GFTFSTYW	46
mA75 LCDR3	WQGSHFPQT	47
mA75 LCDR2	LVC	48
mA75 LCDR1	QSLLDSEGKTY	49
mB109 HCDR3	TRGLRRWGAMDY	50
mB109	ILPGSGLT	51

HCDR2		
mB109 HCDR1	GFTFSTYW	52
mB109 LCDR3	QQHYSSPYT	53
mB109 LCDR2	SAS	54
mB109 LCDR1	QDVSSA	55
mB28 HCDR3	ARLSTGTRGAFDY	56
mB28 HCDR2	ILPGSGGA	57
mB28 HCDR1	GYTFSISW	58
mB28 LCDR3	QHHYGTPPT	59
mB28 LCDR2	NAK	60
mB28 LCDR1	ENVYSY	61
mC45 HCDR3	ARDYYGSSHGLMDY	62
mC45 HCDR2	IHPGSGVT	63
mC45 HCDR1	GYAFTNYL	64
mC45 LCDR3	LQYDEFPRT	65
mC45 LCDR2	RAN	66
mC45 LCDR1	QDINSY	67
mE16	ARGLRHWGYFDV	68

HCDR3		
mE16 HCDR2	LRTGGNT	69
mE16 HCDR1	GFTFSNYG	70
mE16 LCDR3	QQHYSSPWT	71
mE16 LCDR2	SAS	72
mE16 LCDR1	QDISNY	73
mE21 HCDR3	MYGNYPYYFDY	74
mE21 HCDR2	IDPENGDT	75
mE21 HCDR1	GFNIKDYY	76
mE21 LCDR3	QQGNTLPWT	77
mE21 LCDR2	YTS	78
mE21 LCDR1	QDISNY	79
m= murino; VH=cadena pesada variable; VL=cadena ligera variable;		

En otra realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-PAI-1 que se unen al mismo epítopo o inhiben competitivamente un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenden las secuencias de aminoácidos de la región VH y VL expuestas en el SEQ ID NO: 6 y 7 respectivamente. Tales anticuerpos pueden identificarse utilizando análisis de unión de competencia rutinarios, incluyendo, por ejemplo, ensayos de competición basados resonancia de plasmón superficial (SPR).

III. Anticuerpos Anti-PAI-1 Modificados

En ciertas realizaciones, los anti PAI-1-anticuerpos descritos en la presente

memoria pueden comprender una o más modificaciones. Las formas modificadas de anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden prepararse utilizando cualquier mecanismo conocido en la técnica.

i) Reducción de la Inmunogenicidad

En ciertas realizaciones, los anticuerpos, anti-PAI-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria son modificados para reducir su inmunogenicidad utilizando mecanismos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden ser quimerizados, humanizados, o desinmunizados.

En una realización, un anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en la presente memoria puede ser quimérico. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos, o fragmentos de los mismos, son conocidos en la técnica. *Véase, p. ej.,* Morrison, *Science* 229:1202, 1985; *Oi et al., BioTechniques* 4:214, 1986; Gillies *et al., J. Immunol Methods* 125:191, 1989; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397, que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. Las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851, 1984; Neuberger et al., Nature 312: 604, 1984; Takeda *et al., Nature* 314:452, 1985) se pueden emplear para la síntesis de dichas moléculas. Por ejemplo, se puede fusionar una secuencia genética que codifica una especificidad de unión de una molécula de anticuerpo de ratón anti-PAI-1 junto con una secuencia de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Según se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, p. ej., anticuerpos humanizados.

En otra realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en la presente memoria está humanizado. Los anticuerpos humanizados tienen una especificidad de unión que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo y regiones marco no humanas de una molécula de anticuerpo humano. A menudo, los residuos del marco en

las regiones marco humanas se sustituirán por el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, o mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los residuos de las CDR y del marco para identificar residuos del marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos del marco inusuales en posiciones concretas. Véase por ejemplo Queen el al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.585.089; Riechmann *et al., Nature* 332:323, 1988, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; Publicación Internacional Núm. WO 91/09967; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), remodelación o reconstrucción de la superficie (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28: 489, 1991; Studnicka *et al., Protein Engineering* 7:805, 1994; Roguska *et al., PNAS* 91:969, 1994), y mezcla aleatoria de cadenas (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.565.332).

En una realización concreta, se emplea un método de humanización que se basa en el impacto de la flexibilidad molecular del anticuerpo durante y en reconocimiento inmunitario (véase la Publicación Internacional Núm. WO2009/032661, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad). La flexibilidad de la proteína está relacionada con el movimiento molecular de la molécula de proteína. La flexibilidad proteína es la capacidad de una proteína completa, una parte de una proteína o de un solo residuo de aminoácido para adoptar un conjunto de conformaciones que difieren significativamente entre sí. La información acerca de la flexibilidad de proteína se puede obtener mediante la realización de experimentos de cristalografía de rayos X de proteínas (*véase, por ejemplo*, Kundu et al., *Biophys. J.* 83:723, 2002), experimentos de resonancia magnética nuclear (*véase, por ejemplo*, Freedberg et al., *J. Am. Chem. Soc.* 20:7916, 1998) o llevando a cabo simulaciones de dinámica molecular (MD). Una simulación MD de una proteína se realiza en un ordenador y permite determinar el movimiento de todos los átomos de la proteína a lo largo de un período de tiempo mediante el cálculo de las interacciones físicas de los átomos entre sí. El resultado de una simulación MD es la trayectoria de la proteína estudiada durante el período de tiempo de la simulación. La trayectoria es un conjunto de conformaciones de proteínas, también denominadas instantáneas, que se muestrean periódicamente durante el período de la simulación, por ejemplo, cada 1 picosegundo (ps). Es mediante el análisis del conjunto de instantáneas que se puede cuantificar la flexibilidad de los residuos de aminoácidos de la proteínas.

Por lo tanto, un residuo flexible es un que adopta un conjunto de diferentes conformaciones en el contexto del polipéptido en el que reside ese residuo. Los métodos de MD son conocidos en la técnica, véase, p. ej., Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988). Diversos soportes lógicos permiten simulaciones de MD, como Amber (véanse Case *et al., J. Comp. Chem*. 26:1668, 2005; Brooks *et al., J. Comp. Chem.* 4:187, 1983; y MacKerell et al (1998) en "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer *et al.*, eds Chichester: John Wiley & Sons) o Impact (véase Rizzo *et al., J. Am. Chem. Soc.*; 122:12898, 2000).

La mayoría de los complejos de proteínas comparten una superficie relativamente grande y plana sepultada y se ha demostrado que la flexibilidad de las parejas de unión proporciona el origen de su plasticidad, lo que les permite adaptarse conformacionalmente el uno al otro (Sundberg y Mariuzza, *Sreucture* 8, R137-R142, 2000). Como tal, se ha demostrado que los ejemplos de "ajuste inducido" desempeñan un papel dominante en las interfaces de proteína-proteína. Además, existe un cuerpo creciente de datos que muestran que las proteínas en realidad unen ligandos de formas, tamaños y composición diversos (*Protein Science* 11:184-187, 2002) y que la diversidad conformacional parece ser un componente esencial de la capacidad para reconocer los diferentes compañeros (James *et al., Science* 299: 1362, 2003). Los residuos flexibles están implicados en la unión de compañeros de proteína-proteína (Grunberg *et al.*, *Structure* 14, 683, 2006).

Los residuos flexibles pueden adoptar una variedad de conformaciones que proporcionan un conjunto de zonas de interacción que son susceptibles de ser reconocidas por las células B de memoria y de desencadenar una respuesta inmunogénica. Por lo tanto, un anticuerpo puede humanizarse mediante la modificación de un número de residuos del marco de modo que el conjunto de conformaciones y de zonas de reconocimiento desplegado por el anticuerpo modificado se parezca tanto como sea posible a las adoptadas por un anticuerpo humano. Eso puede lograrse mediante la modificación de un número limitado de residuos: (1) construyendo un modelo de homología del mAb parental y ejecutando una simulación de MD; (2) analizando los residuos flexibles e identificando los residuos más flexibles de una molécula de anticuerpo no humano, así como identificando los residuos o motivos que puedan ser una fuente de heterogeneidad o de reacción de degradación; (3) identificando un anticuerpo humano que despliegue el conjunto más similar de zonas de reconocimiento como anticuerpo parental; (4) determinando los residuos flexibles que van a ser mutados, también son mutados los residuos o motivos que puedan ser una fuente de heterogeneidad y la

degradación; y (5) comprobando la presencia de epítopos de células T o B conocidos. Los residuos flexibles pueden encontrarse utilizando un cálculo de MD como se ilustra en la presente memoria utilizando un modelo de disolvente implícito, que representa la interacción del disolvente acuoso con los átomos de la proteína a lo largo del período de tiempo de la simulación.

Una vez que se ha identificado el conjunto de residuos flexibles dentro de las cadenas ligeras y pesadas variables, se identifica un conjunto de marcos de regiones variables de cadena pesada y ligera humanas que se parecen mucho al del anticuerpo de interés. Eso se puede realizar, por ejemplo, utilizando una búsqueda BLAST en el conjunto de residuos flexibles contra una base de datos de secuencia de la línea germinal humana de anticuerpos. También se puede realizar mediante la comparación de la dinámica del mAb parental con la dinámica de una biblioteca de estructuras canónicas de la línea germinal. Los residuos de CDR y residuos vecinos son excluidos de la búsqueda para asegurar que se conserva una alta afinidad por el antígeno. A continuación se reemplazan los residuos flexibles.

Cuando varios residuos humanos muestran homologías similares, la selección es conducida también por la naturaleza de los residuos que puedan afectar al comportamiento en solución del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, los residuos polares suelen aparecer en bucles flexibles expuestos por encima de los residuos hidrófobos. Los residuos que son una fuente potencial de inestabilidad y heterogeneidad también están mutados, incluso si no se encuentran en las CDR. Eso incluirá metioninas expuestas puesto que la formación de sulfóxido puede ser resultado de radicales de oxígeno, escisión proteolítica de los enlaces lábiles en medio ácido tales como los del dipéptido Asp-Pro (Drug Dev. Res. 61:137, 2004), sitios de desamidación encontrados con un residuo de asparragina expuesto seguido de un pequeño aminoácido, tal como Gly, Ser, Ala, His, Asn o Cys (*J. Chromatog.* 837:35, 2006) y sitios de N-glicosilación, tales como el sitio Asn-X-Ser/Thr. Típicamente, las metioninas expuestas serán sustituidas por una Leu, las asparraginas expuestas serán reemplazadas por una glutamina o por un aspartato, o el residuo subsiguiente será cambiado. Para el sitio de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), se cambiarán el residuo de Asn o de Ser/Thr.

La secuencia del anticuerpo compuesto resultante es comprobada para determinar la presencia de epítopos de células B o células T lineales conocidos. Se realiza una búsqueda, por ejemplo, con la base Immune Epitope Data Base (IEDB) (*PLOS Biol*. (2005) 3(3)e91) disponible públicamente. Si un epítopo conocido se encuentra dentro de la secuencia compuesta, se recupera y se sustituye otro conjunto de secuencias

humanas. Por lo tanto a diferencia del método de reconstrucción de la superficie la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.639.641, las respuestas inmunogénicas mediadas por células B y mediadas por células T son abordadas por el método. El método también evita el problema de la pérdida de actividad que se observa a veces con injerto de CDR (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.530.101). Además, también se consideran los problemas de estabilidad y solubilidad en el procedimiento de modificación genética y selección, que da como resultado un anticuerpo que está optimizado para una baja inmunogenicidad, una alta afinidad por el antígeno y una mejora de las propiedades biofísicas.

En algunas realizaciones, la desinmunización se puede utilizar para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Según se utiliza en la presente memoria, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para modificar epítopos de células T (*véase, p. ej.*, las Publicaciones Internacionales Núms. W09852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, se pueden analizar secuencias VH y VL del anticuerpo de partida y se puede generar un "mapa" del epítopo de células T humano a partir de cada región V que muestra la ubicación de los epítopos con respecto a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítopos de células T individuales del mapa epitópico de células T se analizan para identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alteración de la actividad del anticuerpo final. Se diseña una gama de secuencias de VH y VL alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente a una gama de anticuerpos específicos de PAI-1 o sus fragmentos para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento específicos descritos en la presente memoria, que a continuación se someten a ensayo para determinar su función. Típicamente, se generan y se someten a ensayo entre 12 y 24 anticuerpos variantes. A continuación, los genes de cadena pesada y ligera completos que comprenden las regiones V modificada y C humana se clonan en vectores de expresión y los plásmidos subsiguientes se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpo completo. Los anticuerpos se comparan a continuación en análisis bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

ii) Funciones efectoras y Modificaciones de Fc

Los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden comprender una región constante de anticuerpo (p. ej., una región constante de IgG, una región

constante de IgG humana, una región constante de IgGl o IgG4 humanas) que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante de anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento estimula también la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Adicionalmente, los anticuerpos se unen a los receptores en varias células a través de la región Fc, uniéndose un sitio de unión del receptor de Fc en la región Fc de anticuerpo a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Existen una serie de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares provoca una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la inclusión y la destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, el aclaramiento de complejos inmunitarios, la lisis de las células recubiertas con anticuerpo diana por las células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria se unen a un receptor de Fc-gamma. En realizaciones alternativas, los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden comprender una región constante que carece de una o más funciones efectoras (p. ej., actividad ADCC) o es incapaz de unirse al receptor de Fc.

Ciertas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen anticuerpos anti-PAI-1 en los que al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de la región constante se ha eliminado o alterado de otro modo con el fin de proporcionar características bioquímicas deseadas tales como reducción o mejora de las funciones efectoras, la capacidad para dimerizar de forma no covalente, el aumento de capacidad para localizarse en un sitio concreto en el organismo (p. ej., el sitio de un tumor o en un órgano concreto), la reducción de vida media en suero, o el aumento de la vida media en suero en comparación con un anticuerpo completo, inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria son anticuerpos de dominio suprimido que comprenden una cadena de polipéptido similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará

un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará la totalidad o parte del dominio CH2.

En ciertas otras realizaciones, los anticuerpos anti-PAI-1 comprenden regiones constantes derivadas de diferentes isotipos de anticuerpos (p. ej., regiones constantes de dos o más de una IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humanas). En otras realizaciones, los anticuerpos anti-PAI-1 comprenden una bisagra quimérica (es decir, una bisagra que comprende porciones de bisagra derivadas de dominios bisagra de diferentes isotipos de anticuerpo, p. ej., un dominio de bisagra superior de una molécula de IgG4 y un dominio de bisagra medio de IgG1). En una realización, un anticuerpo anti -PAI-1 comprende una región Fc o una porción de la misma de una molécula de IgG4 humana y una mutación Ser228Pro (numeración de Kabat) en la región central de la bisagra de la molécula.

En ciertos anticuerpos anti-PAI-1, la porción Fc puede mutarse para aumentar o disminuir la función efectora utilizando mecanismos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la deleción o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante pueden reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado en circulación aumentando de este modo la localización del tumor. En otros casos, puede ser que modificaciones de la región constante compatibles con la presente invención moderen la unión del complemento y reduzcan de este modo la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden utilizar otras modificaciones de la región constante para modificar los enlaces disulfuro o residuos de oligosacáridos que permiten la mejora de la localización debido al aumento de especificidad de antígeno o de flexibilidad. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, la biodistribución y la vida media en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación indebida.

En ciertas realizaciones, un dominio Fc empleado en un anticuerpo descrito en la presente memoria es una variante de Fc. Según se utiliza en la presente memoria, el término "variante de Fc" se refiere a un dominio Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos con respecto al dominio Fc de tipo salvaje del que dicho dominio Fc deriva. Por ejemplo, cuando el dominio Fc deriva de un anticuerpo IgG1 humano, la variante de Fc de dicho dominio Fc de IgG1 humana comprende al menos una sustitución de aminoácido con respecto a dicho dominio Fc.

La sustitución o sustituciones de aminoácidos de una variante de Fc se pueden localizar en cualquier posición (es decir, cualquier posición de aminoácido del convenio

EU) dentro del dominio Fc. En una realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio bisagra o porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH2 o porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH3 o porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situado en un dominio CH4 o porción del mismo.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden emplear cualquier variante de Fc reconocida en la técnica que se conoce por conferir una mejora (p. ej., reducción o potenciación) de la función efectora o de la unión a FcR. Dichas variantes de Fc pueden incluir, por ejemplo, una cualquiera de las sustituciones de aminoácidos describas en las Publicaciones de Patente Internacional PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2 o las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; y 7.083.784, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia. En una realización ilustrativa, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácido en la posición EU 268 (p. ej., H268D o H268E). En otra realización ilustrativa, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede comprender una sustitución de aminoácido en la posición EU 239 (p. ej., S239D o 8239E) o posición EU 332 (p. ej., I332D o I332Q).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácido que altera las funciones efectoras independiente del antígeno del anticuerpo, en particular, la vida media del anticuerpo circulante. Tales anticuerpos presentan ya sea aumento o disminución de la unión a FcRn en comparación con los anticuerpos que carecen de estas sustituciones, por lo tanto, tienen un aumento o una disminución de la vida media en suero, respectivamente. Se prevé que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tengan vidas medias en suero más largas, y tales moléculas tienen aplicaciones útiles en

los métodos de tratamiento de mamíferos donde se desea larga vida media del anticuerpo administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno crónicos. Por el contrario, se espera que las variantes de Fc con disminución de la afinidad de unión por FcRn tengan vidas medias más cortas, y tales moléculas también son útiles, por ejemplo, para su administración a un mamífero donde un tiempo de circulación acortado puede ser ventajoso, p. ej., para la formación de imágenes de diagnóstico in vivo o en situaciones en las que el anticuerpo de partida tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante periodos prolongados. Las variantes de Fc con disminución de la afinidad de unión por FcRn también tienen menos probabilidades de cruzar la placenta y, por lo tanto, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que puede ser deseable la reducción de la afinidad de unión por FcRn incluyen aquellas aplicaciones en las se desea la localización del cerebro, riñón o hígado. En una realización ilustrativa, los anticuerpos alterados descritos en la presente memoria muestran reducción del transporte a través del epitelio de los glomérulos del riñón desde la vasculatura. En otra realización, los anticuerpos alterados descritos en la presente memoria muestran reducción del transporte través de la barrera hematoencefálica (BHE) desde el cerebro, al espacio vascular. En una realización, un anticuerpo con unión a FcRn alterada comprende un dominio Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio Fc. El bucle de unión a FcRn se compone de residuos de los aminoácidos 280-299 (numeración de acuerdo con Kabat). Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas que alteran la actividad de unión a FcRn se describen en la Publicación Internacional PCT Núm. WO05/047327 que se incorpora a la presente memoria como referencia. En ciertas realizaciones ilustrativas, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos la presente memoria comprenden un dominio Fc que tiene una o más de las siguientes sustituciones: V284E, H285E, N286D, K290E y S304D (numeración de Kabat).

En otras realizaciones, los anticuerpos, para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4, que es alterada para reducir o eliminar la glicosilación. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede comprender también una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácido que altera la glicosilación del anticuerpo. Por ejemplo, dicha variante de Fc puede haber reducido la glicosilación (p. ej., glicosilación ligada a N u O). En realizaciones ilustrativas, la variante de Fc comprende glicosilación reducida de los glicanos ligados a N que normalmente se encuentran en la posición de aminoácido 297 (numeración EU). En

otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución de aminoácido cerca o dentro de un motivo de glicosilación, por ejemplo, un motivo de glicosilación ligado a N contiene la secuencia de aminoácidos NXS o NXT. En una realización concreta, el anticuerpo comprende una variante de Fc con una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido 228 o 299 (numeración EU). En realizaciones más concretas, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 o IgG4 que comprende una mutación S228P y una T299A (numeración EU).

Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas que confieren reducción o alteración de la glicosilación se describen en la Publicación Internacional PCT Núm. WO05/018572, que se incorpora a la presente memoria como referencia. En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria están modificados para eliminar la glicosilación. Tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden ser referidos como anticuerpos "agli", o fragmentos de los mismos (p. ej., anticuerpos "agli"). Aunque no se está limitado por la teoría, se cree que los anticuerpos "agli", o fragmentos de los mismos, pueden tener un mejor perfil de seguridad y de estabilidad in vivo. Los anticuerpos agli ilustrativos, o fragmentos de los mismos, comprenden una región Fc de un anticuerpo aglicosilado IgG4 que está desprovisto de la función efectora de Fc eliminando así el potencial de toxicidad mediada por Fc para los órganos vitales normales que expresan PAÏ-1. En otras realizaciones más, los anticuerpos, o sus fragmentos, descritos en la presente memoria comprenden un glicano alterado. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un número reducido de residuos de fucosa en un N-glicano en la Asn297 de la región Fc, es decir, es afucosilado. En otra realización, el anticuerpo puede tener un número alterado de residuos de ácido siálico en el N-glicano en la Asn297 de la región Fc.

iii) Anclaje covalente

Los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden ser modificados, por ejemplo, mediante el ancaje covalente de una molécula al anticuerpo de tal forma que el anclaje covalente no evite que el anticuerpo se una específicamente a su epítopo cognado. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria pueden ser modificados mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a

escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria pueden adicionalmente fusionarse de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o el extremo C o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PAI-1 pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en análisis de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT Núm. WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.314.995; y el documento EP 396.387.

Los anticuerpos anti-PAI-1 pueden fusionarse con polipéptidos heterólogos para aumentar la vida media in vivo o para su uso en inmunoanálisis utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, se puede conjugar PEG con los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria para aumentar su vida media in vivo. (Leong, S. R., *et al., Cytokine* 16:106, 2001: Adv in Drug Deliv. Rev. 54:531, 2002; o Weir et al., Biocbem. Soc. Transactions 30:512, 2002).

Por otra parte, los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91313), entre otros, muchos de los cuales son asequibles comercialmente. Como describen Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, Cell 37:767, 1984) y la etiqueta "flag".

Los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de una variedad de moléculas, p. ej., para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de dianas, o para el diagnóstico por imágenes o la terapia del paciente. Los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden marcarse o conjugarse ya sea antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en la presente memoria pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos,

modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, o PEG.

La presente invención abarca adicionalmente anticuerpos anti-PAI-1 conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos anti-PAI-1 pueden usarse diagnósticamente para, por ejemplo, controlar el desarrollo o la progresión de un trastorno celular inmune (p. ej., CLL) como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, p. ej., determinar la eficacia de un tratamiento o régimen de prevención proporcionados. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento de los anticuerpos anti-PAI-1 a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminescentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.741.900 para los iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos no limitantes de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos no limitantes de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo no limitante de un material luminiscente incluye luminol; Los ejemplos no limitantes de materiales bioluminescentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados no limitantes incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In o ^{99}Tc.

Los anticuerpos anti-PAI-1 para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria pueden conjugarse con citotoxinas (tales como radioisótopos, fármacos citotóxicos o toxinas) agentes terapéuticos, agentes citostáticos, toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, ligandos inmunológicamente activos (p. ej., linfoquinas u otros anticuerpos en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como a una célula efectora tal como una célula T), o PEG.

En otra realización, un anticuerpo anti-PAI-1 para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente memoria puede conjugarse con una molécula que reduce el crecimiento de las células tumorales. En otras realizaciones, las composiciones descritas pueden comprender anticuerpos, o fragmentos de los mismos, acoplados a los fármacos o profármacos. Otras realizaciones más descritas la presente

memoria comprenden el uso de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, conjugados con biotoxinas específicas o sus fragmentos citotóxicos tales como ricina, gelonina, exotoxina de Pseudomonas o toxina de la difteria. La selección de cuyos anticuerpos conjugados o no conjugados para su uso dependerá del tipo y la etapa del cáncer, del uso de tratamiento complementario (p. ej., quimioterapia o radiación externa) y de la afección del paciente. Se apreciará que un experto en la técnica podría fácilmente realizar tal selección en vista de las enseñanzas de la presente memoria.

Se apreciará que, en los estudios anteriores, los anticuerpos anti-tumorales marcados con isótopos se han utilizado con éxito para destruir las células tumorales en modelos animales, y en algunos casos en los seres humanos. Los radioisótopos ilustrativos incluyen: ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re y ^{188}Re. Los radionúclidos actúan mediante la producción de radiación ionizante que causa múltiples roturas de cadena en el ADN nuclear, lo que conduce a la muerte celular. Los isótopos utilizados para producir productos conjugados terapéuticos producen típicamente partículas alfa o beta de alta energía que tienen una longitud de trayectoria corta. Tales radionúclicos destruyen las células que se encuentran en estrecha proximidad, por ejemplo las células neoplásicas a las que se ha anclado o en las que ha entrado el producto conjugado. Tienen poco o ningún efecto sobre células no localizadas. Los radionúclidos son esencialmente no inmunogénicos.

IV. Expresión de Anticuerpos Anti-PAI-1, o Fragmentos de Unión a Antígeno de los mismos

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar los anticuerpos anti-PAI-1 descritos la presente memoria como se ha expuesto anteriormente, los genes son insertados típicamente en un vector de expresión para su introducción en células anfitrionas que pueden ser utilizadas para producir la cantidad deseada de los anticuerpos reivindicados, o sus fragmentos.

En otras realizaciones, los anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de los mismos, según la invención pueden ser expresados utilizando constructos policistrónicos. En tales sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés, tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de un único constructo policistrónico. Estos sistemas utilizan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de los polipéptidos descritos en la presente memoria en células anfitrionas eucarióticas. Las secuencias IRES compatibles se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.193.980, que se

incorpora a la presente memoria como referencia. Los expertos en la técnica apreciarán que tales sistemas de expresión se pueden utilizar para producir eficazmente la gama completa de polipéptidos descritos en la presente solicitud.

En una realización, la línea de células anfitrionas utilizada para la expresión del anticuerpo tiene origen mamífero; los expertos en la técnica pueden determinar las líneas celulares anfitrionas concretas que son más adecuadas para el producto del gen que se desea expresar en las mismas. Las líneas de células anfitrionas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR menos), HeLa (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblastos de hámster Chino) BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos), 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona glicosilación alterada, por ejemplo, afucosilación, del anticuerpo allí expresado (p. ej., líneas de células CHO PER.C6.RTM. (Crucell) o FUT8-knock-out (Células Potelligent.RTM.) (Biowa, Princeton, NJ.)). En una realización se pueden utilizar células NS0. Las células CHO se pueden utilizar en ciertas realizaciones específicas. Las líneas celulares anfitrionas son asequibles típicamente de servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o de la bibliografía publicada.

La producción in vitro permite el aumento a escala para proporcionar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Los mecanismos para el cultivo de células de mamífero bajo condiciones de cultivo de tejidos son conocidos en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor con agitación neumática o en un reactor con agitación continua, cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microcuentas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si fuera necesario o se desea, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar por medio de los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno)afinidad.

Los genes que codifican los anticuerpos Anti-PAI-1, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria también se pueden expresar en células que no sean de mamíferos tales como células bacterianas o de levaduras o vegetales. A este respecto, se apreciará que también se pueden transformar diversos microorganismos no mamíferos unicelulares tales como las bacterias; es decir, aquellos susceptibles de ser cultivados en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de Escherichia coli o Salmonella;

Baciliaceae, tales como Bacillus subtilis; Pneumococcus; Streptococcus, y Haemophilus influenzae. Se apreciará adicionalmente que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos pueden formar parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos deben ser aislados, purificados y a continuación ensamblados en moléculas funcionales.

Además de procariotas, también se pueden utilizar microbios eucarióticos. Saccharomyces cerevisiae, o la levadura común de panadería, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucarióticos, aunque están comúnmente disponibles varias otras cepas. Para la expresión en Saccharomyces, se utiliza comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcornb *et al.,* Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC Núm. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión trpl como una característica del genoma de la célula anfitriona de levadura proporciona en ese caso un entorno eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano.

V. Formulaciones Farmacéuticas y Métodos de Administración de los Anticuerpos Anti-PAI-1.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti PAI-1, o fragmentos del mismo.

Los métodos de preparación y administración de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria a un sujeto son bien conocidos por o son determinados fácilmente por los expertos en la técnica. La vía de administración de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descrita en la presente memoria puede ser oral, parenteral, mediante inhalación o tópica. El término parenteral, según se utiliza en la presente memoria incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Las formas de administración parenteral intravenosa, intraarterial, subcutánea e intramuscular se pueden utilizar en ciertas realizaciones. Si bien todas estas formas de administración están claramente contempladas dentro del alcance descrito la presente memoria, una forma para la administración sería una solución para inyección, en particular, para inyección o goteo intravenoso o intraarterial. Por lo general, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón de acetato, fosfato o citrato), un agente tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por

ejemplo albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas de la presente memoria, los polipéptidos pueden ser suministrados directamente al sitio de la población celular adversa aumentando de este modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. En la presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M (p. ej., 0,05 M) o solución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato añadido, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares. Más concretamente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y en una realización conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En ciertas realizaciones, se incluyen agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de

aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un compuesto activo (p. ej., un anticuerpo por sí mismo o combinado con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en la presente memoria, según sea necesario, seguido de esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación pueden ser secado al vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyectables se procesan, se envasan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, las preparaciones pueden ser empaquetadas y vendidas en forma de un kit, tales como los descritos en el documento U.S. Ser. co-pendiente Núm. 09/259.337 y el documento US Ser. Núm. 09/259.338 cada uno de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia. Tales artículos de fabricación tendrán en una realización etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece, o está predispuesto a trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

Las dosis eficaces de los anticuerpos estabilizados, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, ya sea el paciente humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero los mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos también puede ser tratados. Las dosificaciones de tratamiento pueden valorarse utilizando los métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo descrito en la presente memoria, la dosis puede variar, p. ej., de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/'kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), de peso corporal del anfitrión. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10

mg/kg, o en realizaciones concretas, al menos, 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores también estén dentro del alcance descrito la presente memoria.

A los sujetos se les pueden administrar tales dosis diarias, en días alternativos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento ilustrativo implica la administración en múltiples dosificaciones durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ilustrativos adicionales implican la administración una vez por cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación ilustrativos incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanales, en algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado puede encontrarse dentro de los intervalos indicados,

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, p. ej., diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de polipéptido o molécula diana en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una cierta concentración de anticuerpo o toxina en plasma, p. ej., 1-1000 ug/ml o 25-300 ug/ml. Alternativamente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente, en general, los anticuerpos humanizados muestran la vida media más larga, seguidos por los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. En una realización, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria pueden administrarse en forma no conjugada. En otra realización, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden administrarse varias veces en forma conjugada, En otra realización más, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria pueden administrarse en forma no conjugada, después, en forma conjugada, o viceversa.

La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que ya no está en estado de enfermedad para mejorar la resistencia del

paciente. Tal cantidad se define como una "dosis eficaz profiláctica". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y de la inmunidad general, pero generalmente varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta (p. ej., de aproximadamente! a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, siendo más comúnmente utilizadas dosis de 5 a 25 mg para los productos radioinmunoconjugados y dosis más altas para las moléculas conjugadas de citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y, en realizaciones concretas, hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

En una realización, un sujeto puede ser tratado con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria (p. ej., en un vector). Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos oscilan de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 ug a 10 mg, o 30-300 ug de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10 a 100, o más, viriones por dosis.

Los agentes terapéuticos se pueden administrar por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para medios de tratamiento profiláctico o terapéutico. La inyección intramuscular o intravenosa en la fusión se puede utilizar para la administración de un anticuerpo descrito en la presente memoria. En algunos procedimientos, los anticuerpos terapéuticos, o fragmentos de los mismos, se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos, o sus fragmentos, se administran como una composición de liberación sostenida o dispositivo, tal como un dispositivo Medipad™.

Los agentes descritos en la presente memoria opcionalmente pueden administrarse combinados con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesitan tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico). Los agentes adicionales son aquellos que son reconocidos en la técnica y se administran de forma rutinaria para un trastorno concreto.

Las dosis eficaces de tratamiento único (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos marcados con ^{90}Y descritos en la presente memoria oscilan entre

aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, y en una realización entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones no ablativas de médula ósea en tratamiento único de anticuerpos marcados con oscilan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, y en una realización entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones ablativas en tratamiento único eficaz (es decir, se puede requerir un transplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos marcados con ^{131}I oscilan entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, y en una realización entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Conjuntamente con un anticuerpo quimérico modificado, debido a la vida media en circulación más larga vis-a-vis de los anticuerpos murinos, en un tratamiento único eficaz no ablativo de médula ósea las dosificaciones de anticuerpos quiméricos marcados con ^{131}I oscilan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, y en una realización, menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de diagnósticos por imágenes para, p. ej., el marcador ^{111}In, son típicamente menos de aproximadamente 5 mCi.

Si bien se ha adquirido una gran cantidad de experiencia clínica con ^{131}I e ^{90}Y, otros radiomarcadores son conocidos en la técnica y se han usado para propósitos similares. Otros radioisótopos más se utilizan para el diagnóstico por imágenes. Por ejemplo, los radioisótopos adicionales que son compatibles con el alcance de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ^{123}I, ^{125}I, ^{32}P, ^{57}Co, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{77}Br, ^{81}Rb, ^{81}Kr, ^{87}Sr, ^{113}In, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb, ^{206}Bi, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{47}Sc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{153}Sm, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{225}Ac, ^{211}A y ^{213}Bi. A este respecto los emisores alfa, gamma y beta son todos compatibles con la presente invención. Adicionalmente, en vista de la presente descripción se afirma que un experto en la técnica podría determinar fácilmente qué radionúclidos son compatibles con un curso de tratamiento seleccionado sin experimentación indebida. Con este fin, los radionúclidos adicionales que ya han sido utilizados en el diagnóstico clínico incluyen ^{125}I, ^{123}I, ^{99}Tc, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{67}Ga, ^{68}Ga, así como ^{111}In. Los anticuerpos también se han marcado con una variedad de radionúclidos para su uso potencial en la inmunoterapia dirigida (Peirersz *et al.*, Immunol. Cell Biol. 65: 111, 1987). Estos radionúclidos incluyen ^{188}Re y ^{186}Re así como ^{199}Au y ^{67}Cu en menor medida. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.460.785 proporciona datos adicionales con respecto a este tipo de radioisótopos y se incorpora a la presente memoria como referencia.

Como se comentó previamente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria, se puede administrar en una cantidad

farmacéuticamente eficaz para el tratamiento in vivo de trastornos de mamíferos. En este sentido, se apreciará que los anticuerpos descritos, o fragmentos de los mismos, se formularán con el fin de facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo, y en ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden un portador farmacéuticamente aceptable, no tóxico, estéril tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, se emplea una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito la presente memoria, conjugado o no conjugado con un agente terapéutico, para referirse a una cantidad suficiente para alcanzar la unión efectiva a una diana y para lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula. En el caso de las células tumorales, el polipéptido en ciertas realizaciones será capaz de interactuar con antígenos immunoreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento de la muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden administrarse en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido.

En consonancia con el alcance de la presente descripción, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden administrar a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento anteriormente mencionados en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden administrar a tal ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo descrito en la presente memoria con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables convencionales de acuerdo con técnicas conocidas. Un experto en la técnica reconocerá que la forma y el carácter del portador o diluyente farmacéuticamentes aceptables viene dictada por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán adicionalmente que puede llegar a ser particularmente eficaz un cóctel que comprende una o más especies de polipéptidos de acuerdo con la presente invención.

VI. Métodos de Tratamiento de Enfermedades o Trastornos Asociados a PAI-1

Los anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de los mismos, descritos en la presente memoria son útiles para suscitar antagonismo de la actividad de PAI-1. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a PAI-1 mediante la administración a un sujeto que lo necesite de

una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria.

Las enfermedades o trastornos asociados a PAI-1 susceptibles de tratamiento incluyen, sin limitación, afecciones fisiopatológicas tales como fibrosis de riñón, hígado o pulmón o la prevención de la formación de adherencias abdominales.

La aparición de adherencias intraabdominales es una causa importante de enfermedad humana. Las complicaciones de las adherencias pueden ser tan graves como una obstrucción intestinal potencialmente mortal, pero el dolor pélvico crónico y la infertilidad en las mujeres también son secuelas comunes de las adherencias peritoneales. La mayoría de las adherencias es inducida por la cirugía, pero en algunos casos también se ha demostrado que es causada por inflamación, endometriosis, peritonitis química, radioterapia, reacción a cuerpos extraños, y diálisis peritoneal ambulatoria continua. El daño peritoneal provoca una respuesta inflamatoria local que conduce al depósito de fibrina. Se supone que una insuficiencia postraumática en la actividad fibrinolítica peritoneal, causada por una disminución en el activador tisular del plasminógeno (tPA) y un aumento en los inhibidores del activador de plasminógeno PAI-1 y PAI-2, permite que la fibrina depositada se organice en adherencias permanentes.

La opción de tratamiento actualmente disponible y efectivo como Seprafilm® tiene limitaciones para su uso solo en el acceso abierto (laparotomía) y no se puede utilizar en la laparoscopia. La búsqueda de tratamiento potencial está en curso.

En algunas realizaciones ilustrativas, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden facilitar para el tratamiento de la fibrosis renal y la lesión renal aguda asociada, así como de enfermedades renales crónicas, que son las principales causas de insuficiencia renal terminal.

Un experto en la técnica sería capaz, mediante experimentación rutinaria, de determinar qué cantidad eficaz, no tóxica de anticuerpo (o agente terapéutico adicional) tendría el propósito de tratar una enfermedad o trastorno asociados a PAI-1. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido puede variar de acuerdo con factores tales como el estadio de la enfermedad (p. ej., estadio I frente a estadio IV), la edad, el sexo, las complicaciones médicas (p. ej., afecciones o enfermedades con inmunosupresión) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas, o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Generalmente, sin embargo, se

espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día y en una realización de aproximadamente 0,5 a 10, miligramos por kiiogramo de peso corporal por día.

Los diferentes aspectos descritos en la presente memoria y sus realizaciones se pueden combinar entre sí. Además, cualquiera de los aspectos y sus realizaciones descritos anteriormente se puede combinar con cualquiera de los aspectos y realizaciones particulares descritos la presente memoria a continuación.

Algunos aspectos y realizaciones concretas que sirven adicionalmente para ilustrar la presente invención se proporcionan a continuación:

DESCRIPCIÓN DE ASPECTOS Y REALIZACIONES CONCRETOS

Reivindicación 1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende:

(a) una región marco de cadena pesada y una región variable de cadena pesada, comprendiendo la región variable de cadena pesada una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y

(b) una región marco de cadena ligera y una región variable de cadena ligera, comprendiendo la región variable de cadena ligera una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

Reivindicación 2. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 que comprende:

(a) una región marco de cadena pesada y una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, y

(b) una región marco de cadena ligera y una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93,

Reivindicación 3. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que es idéntica en al menos 95% a la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la reivindicación 2, y/o

(b) una región variable de cadena ligera que es idéntica en al menos 95% a la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la reivindicación 2.

Reivindicación 4. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une esencialmente al mismo

epítopo que el anticuerpo de la reivindicación 1.

Reivindicación 5. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende:

(a) una región marco de cadena pesada y una región variable de cadena pesada, comprendiendo la región variable de cadena pesada una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y

(b) una región marco de cadena ligera y una región variable de cadena ligera, comprendiendo la región variable de cadena ligera una región de cadena ligera CDR1 que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 36, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

Reivindicación 6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región variable de cadena pesada comprende el SEQ ID NO: 6, y la región variable de cadena ligera comprende el SEQ ID NO: 7.

Reivindicación 7. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une esencialmente al mismo epítopo que el anticuerpo de la reivindicación 5.

Reivindicación 8. Un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a PAI-1 humano, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 82, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(b) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 83, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 92, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(c) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 84, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(d) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(e) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(f) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 94, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(g) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 87, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma:

(h) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 88, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 96, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(i) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 97, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(j) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 90, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 98, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(l) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(m) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; o

(n) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un

fragmento de unión a antígeno de la misma,

Reivindicación 9. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 22, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 21, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 20; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 24, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 23,

(b) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 28, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 27, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 26; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 31, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 30, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 29,

(c) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 40, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 39, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 38; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 43, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 42, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 41,

(d) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 46, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 45, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 44; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 48, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 47,

(e) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 51, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 50; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1

de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 55, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 54, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 53,

(f) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 58, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 57, y la región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 56; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 61, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 60, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 59,

(g) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 64, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 63, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 62; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 67, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 66, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 65,

(h) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 70, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 69, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 68; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 73, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 72, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 71; o

(i) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 76, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 75, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 74; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 79, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 78, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 77.

Reivindicación 10. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que se une esencialmente al mismo epítopo en PAI-1 que el anticuerpo monoclonal humanizado de la reivindicación 8 o la reivindicación 9.

Reivindicación 11. Un método para restaurar la generación de plasmina que comprende la

administración a un sujeto que lo necesite por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1.

Reivindicación 12. El método de la reivindicación 11, en donde el método trata una afección que comprende aumento de niveles de tejido fibrótico.

Reivindicación 13. El método de la reivindicación 12, en donde la afección es la fibrosis, fibrosis cutánea, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar crónica, fibrosis hepática, fibrosis renal, enfermedad renal crónica, trombosis, trombosis venosa y arterial, trombosis venosa profunda, isquemia de la extremidad periférica, trombosis por coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis, o reestenosis del dispositivo intraluminal.

Reivindicación 14. El método de la reivindicación 11, 12, o 13 en donde el anticuerpo PAI-1 comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Reivindicación 15. El uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por el aumento de los niveles de PAI-1 o el aumento de la sensibilidad a PAI-1, que comprende la administración a un paciente por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como una limitación adicional. El contenido de la Lista de secuencias, la Figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente a la presente memoria como referencia.

Además, de acuerdo con la presente invención, se pueden emplear la biología molecular, la microbiología y las técnicas de ADN recombinante convencionales dentro del conocimiento práctico de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (en la presente memoria “Sambrook et al., 1989”); *DNA Cloning: A Practical Approach,* Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell*

Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Ejemplo 1: Generación de Hibridomas: Inmunización de Ratones con PAI-1. Generación de Proteínas y Anticuerpos

Se desarrollaron anticuerpos que podrían presentar reacción cruzada con PAI-1 activo humano (h) y de mono cinomolgo (cyno) (forma glicosilada o no glicosilada) y que podrían neutralizar la actividad inhibitoria de PAI-1 y restaurar la producción aguas abajo de plasmina siendo de ese modo una agente terapéutico eficaz para el tratamiento de la fibrosis del riñón, el hígado o el pulmón o la prevención de la formación de adherencias abdominales y la formación de cicatriz queloide. Se ha descrito que la neutralización de la función inhibidora de PAI-1 por anticuerpos monoclonales se refiere a tres mecanismos: (1) el bloqueo de PAI-1 a tPA o uPA mediante impedimento estérico, (2) la conversión de PAI-1 a una conformación latente, o (3) la conversión de PAI-1 a una conformación de sustrato.

a) Antígenos

El PAI-1 es secretado por las células en una conformación activa estabilizada por su unión con afinidad subnanomolar a vitronectina. El PAI-1 se somete a cambio conformacional espontáneo de la conformación activa a una conformación latente en el plazo de minutos a 37°C y en el plazo de horas a temperatura ambiente. Una vez unido a la vitronectina, el PAI-1 se vuelve más resistente al cambio conformacional que prolonga la vida media del PAI-1 en la conformación activa de minutos a horas. Para prolongar la vida media de PAI-1 en conformación activa en los animales inmunizados y para permitir que el sistema inmunitario del ratón reconozca la conformación activa de PAI-1, se utilizó un complejo de vitronectina y PAI-1 para las inmunizaciones.

El PAI-1 glicosilado humano producido en células de insecto se adquirió de Innovative Research (Núm. Cat. IGLYHPAI-A). La vitronectina (Núm. Cat. IHVN) y el tPA (Núm. Cat. HTPA-TC) también fueron adquiridos de Innovative Research. Para producir inmunógenos el PAI-1 se incubó con vitronectina a una razón molar 1:1 durante 1 hora a temperatura ambiente, o con tPA a una razón molar 1:1 durante 15 minutos a 37°C. Todos los inmunógenos se prepararon utilizando solución salina estéril como diluyente.

b) Inmunizaciones

Se llevaron a cabo protocolos de producción de hibridomas convencionales conocidos en la técnica para producir anticuerpos. Los enfoques convencionales descritas previamente en la literatura utilizan PAI-1 solo o complejo de PAI-1/tPA. En lugar de eso, los autores de la invención generaron anticuerpos contra la conformación activa de PAI-1. El complejo de vitronectina PAI-L fue utilizado como un enfoque novedoso para la generación de anticuerpos contra PAI-1. Se adoptó una estrategia de tres vértices, esbozada continuación, para generar anticuerpos:

(1) Inmunización clásica de ratones con complejo de PAI-1/vitronectina para obtener esplenocitos de ratón para su fusión con la línea celular de mieloma de ratón como compañero de fusión para producir hibridomas;

(2) Inmunización clásica de ratones con complejo de PAI-1/tPA para obtener esplenocitos de ratón para su fusión con la línea celular de mieloma de ratón como compañero de fusión para producir hibridomas; y

(3) Inmunización clásica de ratones con PAI-1 solo para obtener esplenocitos de ratón para su fusión con la línea celular de mieloma de ratón como compañero de fusión para producir hibridomas.

En el estudio se utilizaron tres ratones por antígeno (PAI-1 solo, complejo de Vn/PAI-1, complejo tPA/PAI-1). Los ratones fueron ratones BALB/C hembra (Charles River, código de la cepa 028) no sometidos a tratamiento previo que tenían 9-20 semanas de edad. El día 0, se inmunizaron nueve ratones por vía intraperitoneal con PAI-1 solo, complejos de Vn/PAI-1 o tPA/PAI-1 en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se mezclaron un total de 10 ug de antígeno por ratón a una razón 1:1 en volumen/volumen de Sigma Adjuvant System (Sigma Núm. Cat. 6322) en un volumen total de 200 µl por ratón. El día 14, los ratones fueron reforzados con la misma cantidad de antígeno y se prepararon de la misma manera que el día 0. El día 21, se recogieron muestras de sangre para la evaluación del título de anticuerpo específico para PAI-1. Los ratones inmunizados con complejos de PAI-1/tPA mostraron muy baja reactividad específica contra PAI-1 y no se utilizaron títulos elevados anti-tPA para las fusiones aguas abajo.

El día 51, el ratón con el título de anticuerpo específico más alto contra PAI-1 y el título más bajo contra la proteína con la que formó complejo PAI-1 (es decir, Vn o tPA), mientras que los que tenían el mayor título contra ortólogos de PAI-1 de ratón y rata se seleccionaron para la fusión. Los ratones seleccionados para la fusión fueron reforzados con PAI-1 solamente o complejo de PAI-1/Vn en PBS como un total de antígeno de 10 ug por ratón mezclado a una razón 1:1 de Sigma Adjuvant System (Sigma Núm. Cat. 6322) en un volumen total de 200 µl por ratón como se ha descrito anteriormente. El día 55 los

ratones fueron sacrificados en una cámara de CO_2, la sangre se recogió a través de punción cardiaca y el bazo se recolectó para la producción de hibridomas Los otros cuatro ratones se sometieron al mismo procedimiento en momentos posteriores (2-4 meses después de que se utilizó el primer ratón para la fusión).

Las titulaciones de suero se realizaron en tres ratones para PAI-1 solo y PAI- I/tPA y dos ratones para PAI-1/Vn utilizando el protocolo de ELISA descrito en el Ejemplo 2 (ELISA de Unión).

Tabla 3: Títulos en Suero para Ratones Inmunizados con PAI-1, PAI-1/Vn o PAI-1/tPA

	Título en Suero Contra PAI-1 (DO_{405})			
Inmunógeno	**Núm. de Ratón**	**DO 1:100**	**DO 1:1000**	**DO 1:10000**
PAI-1	1	2,1	1,9	1
PAI-1	2	2,1	1,4	1
PAI-1	3	2,0	1,4	1
PAI-1/Vn	2	2,15	1,5	1
PAI-1/Vn	3	1,7	1,25	1
PAI-1/tPA	1	1,2	0,8	0,3
PAI-1/tPA	2	1,3	0,9	0,7
PAI-1/tPA	3	1,3	0,9	0,5
SRN	n/a	0,4	0,12	0,07
SRN = suero de ratón normal; n/a=no aplicable DO_{405} utilizando un aparato BioTek Synergy HT				

Los ratones inmunizados con complejo de PAI-1/tPA no alcanzaron los criterios de alto título específico y no se utilizaron para las fusiones (Tabla 3). Basándose en los títulos séricos presentados en la Tabla 3, se seleccionaron para las fusiones un total de 5 ratones con alta titulación específica contra PAI-1.

b) Fusiones

Se seleccionaron para las fusiones los cinco ratones que tenían el título específico más alto contra PAI-1. El día de la fusión, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO_2, se recogió sangre mediante punción cardiaca y los bazos se extirparon y se colocaron en una placa de Petri que contenía 10 ml de Medio de Fusión de Hibridoma libre de suero (IMDM; Medio de Iscove modificado por Dulbecco 500 ml (HyClone SH30259.01). Los esplenocitos fueron expulsados de la capa fibroelástica con fórceps y se lavaron dos veces en 10 ml de IMDM libre de suero (incluyendo centrifugación inicial).

Las células se contaron en un Countess Automated Cell Counter. Las células con compañeros de fusión (mieloma: FO (ATCC ref CRL-1646)) y los esplenocitos se combinaron a continuación en un tubo de 50 ml a una razón de 1:2 a 1:10 (por número de células) y centrifugaron a 970 rpm durante 10 min (centrifugación lenta) para formar un

sedimento suelto. Se precalentó (a 37°C) 1 ml de PEG (PEG 1500 en Hepes al 50% p/v 75 mM, Roche Núm. Cat. 783641 (10783641001), se añadió gota a gota al sedimento celular a los largo de un período de tiempo de 1 minuto y las células se mezclaron después de añadir cada gota de PEG. El sedimento se incubó con PEG durante otro minuto, seguido de la adición de 10 ml de medio IMDM sin suero durante 1 minuto, de manera que se añade el primer ml de los 10 a lo largo de 30 s. Las células se sometieron a centrifugación lenta a 970 rpm durante 10 min para preservar la viabilidad. Las células fusionadas se sembraron en placas de 96 pocillos a 200 ul en medio de selección (200 ml Gibco Hybridoma (SFM Núm. 12045), 20 ml de HyClone SuperLow IgG Defined FBS al 10% (Núm. SH30898.03), 2 ml de penicilina/estreptomicina, 4 ml (Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (Roche Diagnostics 11 363 735 001 (50X)) y 4 ml de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) (Sigma-Aldrich Núm. H0262 (50X)) Las fusiones estuvieron listas para el escrutinio aproximadamente 10 a 14 días más tarde, o cuando el medio en los pocillos viró a color amarillo, los sobrenadantes de los hibridomas desarrollados se sometieron a ensayo a continuación mediante ELISA (Ejemplo 2) para determinar la presencia de anticuerpos que se unen a PAI-1 y complejos de PAI-1/Vn.

Ejemplo 2: ELISA de Unión para el escrutinio de sobrenadante de hibridoma para determinar la especificidad para el complejo de PAI-1 - Vitronectina

Cada fusión de los bazos de los cinco ratones seleccionados dio como resultado aproximadamente 5.000 clones que deben ser examinados para determinar la unión al complejo de PAI-1/Vn como escrutinio primario de primera etapa. El escrutinio primario de los sobrenadantes de hibridoma se llevó a cabo en paralelo utilizando ELISA contra cualquiera de PAI-1 o complejos de PAI-1-Vitronectina para seleccionar hibridomas que se unen específicamente a PAI-1 que forma complejo con vitronectina. Los materiales utilizados para el ELISA fueron los siguientes: Placas de ELISA Immulon 4 HBX (Dynax Núm. Cat. N0541216); Vitronectina humana monomérica a 5 ug/ml (Innovative Research Núm. Cat. IHVN); PAI-1 glicosilado humano (forma activa) (Molecular Innovations Núm. Cat. GLYHPAI-A); PAI-1 de ratón no glicosilado en algunas fusiones (Molecular Innovations Núm. Cat. MPAI-A); un anticuerpo secundario que era anti-IgG ratón de cabra conjugado con HRP (H + L) (Jackson ImminoResearch Labs Núm. 115-035-166); y, sustrato ABTS: Roche Diagnostics (Núm. 11 204 521 001).

Los anticuerpos de control utilizados fueron:

a) 33B8, un anticuerpo inhibidor monoclonal de ratón contra PAI-1 (IgG1; Innovative Research Núm. Cat. IMA-33B8);

b) 33H1, un ratón inhibidor monoclonal anticuerpo contra PAI-1 (IgG1; Innovative Research Núm. Cat. IMA-33H1);

c) 31C9, un anticuerpo no inhibidor monoclonal de ratón contra PAI-1 (IgG1; Innovative Research Núm. Cat. IMA-31C9); y

d) 1B7.11, un anticuerpo de control de isotipo de IgG (mAb anti-TNP - producción propia a partir de la línea celular de hibridoma adquirida de la ATCC (Núm. Cat. TIB-191)

El método ELISA fue el siguiente: las placas se recubrieron con 5 ug/ml de Vn en PBS durante la noche a 4°C a 50 ul/pocillo; el día siguiente la placas se bloquearon 1 hora con 200 ul 1% de albúmina de suero bovino al 1% en PBS (BSA/PBS); las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS: se añadió PAI-1 activo a 2 ug/ml en BSA al 1%/PBS a las placas a 50 ul/pocillo y se incubó 1 hora; las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS; se añadieron diluciones de anticuerpos en BSA al 1%/PBS o sobrenadantes de hibridoma de las placas de 96 pocillos originales a placas de ELISA a 50 ul/pocillo; la placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente (RT); las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS; se añadieron 50 ul de anti-IgG de ratón conjugada con HRP 1:2000 en BSA al 1%/PBS y se incubó 1 hora a temperatura ambiente; las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS; se añadió a las placas sustrato ABTS (una pastilla disuelta en 5 ml) a 50 ul/pocillo) y a continuación las placas se leyeron en el aparato BioTek Sinergy HT utilizando DO405. Una curva patrón típica para la titulación de anticuerpos en el ELISA de unión se muestra en la Figura 2. Los anticuerpos 31C9, 33B8 y 33H1 sirvieron como controles positivos y la IgG1 sirvió como control negativo. La Tabla 4 muestra que de los aproximadamente 5000 clones generados, 675 clones fueron positivos para la unión tanto a PAI-1 como a PAI-1/Vn. Estos clones se escrutaron para determinar la afinidad por Pal-1.

Tabla 4: Número de clones positivos para la unión tanto de PAI-1 como de PAI-1/Vn

Fusión	Inmunógeno	Núm. de Ratón	Núm. de Clones Positivos para la Unión tanto a PAI-1 como a PAI-1/Vn
A	PAI-1/Vn	2	131
B	PAI-1	2	146
C	PAI-1/Vn	3	145
D	PAI-1	3	104
E	PAI-1	1	149

Ejemplo 3: Escrutinio Biacore de Sobrenadantes de Hibridoma mediante Clasificación de Afinidad

La selección de un anticuerpo de alta afinidad con una baja velocidad de disociación se realizó mediante Biacore. El escrutinio de sobrenadantes de hibridoma Biacore se llevó a cabo mediante: (1) escrutinio inverso utilizando anticuerpos anti-PAI-1 inmovilizados anti-ratón o (2) escrutinio directo utilizando PAI-1 libre como ligando o contra Vn inmovilizada.

Los aparatos utilizados fueron BIACORE 2000 o BIACORE 3000 (GE Healthcare), diseñados para el análisis de la interacción biomolecular (BIA) en tiempo real. El chip sensor utilizado fue el chip CM5 (GE Healthcare) con matriz de dextrano carboximetilado en la superficie. Cada chip sensor tiene cuatro celdas de flujo paralelas (Fc). Cada celda de flujo se acopló a Fc de mAb anti-IgG de ratón a través del acoplamiento de amina convencional de acuerdo con el protocolo del fabricante para la preparación de chips.

En el análisis de escrutinio inverso Biacore, se seleccionaron sobrenadantes de hibridoma positivo en el ELISA y se filtraron a través de filtros de 0,2 µm antes de ser inyectados sobre la superficie del chip Biacore. Cada sobrenadante de hibridoma se inyectó en una celda de flujo de celdas de flujo Fc2-FC4 y la IgG en el sobrenadante de hibridoma sería capturada en la superficie del chip por Fc de mAb anti-IgG de ratón, mientras que Fc1 se dejó solo como celda de referencia. A continuación, se inyectó la proteína PAI-1 humana en PBS a Fc1 a Fc4. Se inyectó también tampón PBS sobre la superficie del chip como blanco. Después de restar las señales de las rondas de Fc1 y del tampón del blanco, se analizó la afinidad de unión (KD)/velocidad de disociación (kd) del anticuerpo a partir de los sobrenadantes para la proteína PAI-1 y se clasificó utilizando el soporte lógico Scrubber 2.

En el análisis de escrutinio directo Biacore, se inmovilizó la proteína de vitronectina humana purificada en las celdas de flujo de chips CM1 Fc1 a Fc4. Los PAI-1 humano o de cyno fueron capturados en todas las celdas de flujo. A continuación se inyectaron los sobrenadantes de hibridomas seleccionados filtrados sobre PAI-1 capturado, uno por celda de flujo, excepto Fc1 que fue reservado como celda de flujo de referencia. Se inyectó también tampón PBS sobre la superficie del chip como blanco. Después de restar las señales de Fc1 y las rondas de tampón de blanco, se analizó la afinidad de unión del anticuerpo en el sobrenadante de hibridoma para PAI-1 capturado con vitronectina y se clasificó utilizando soporte lógico Scrubber 2 (versión 2.0a, 2005; BioLogic Software, BioLogic Software Rty Ltd., 116 Blamey Court, Campbell, ACT 2612 Australia).

La Tabla 5 muestra una selección de clones de anticuerpos positivos y negativos de las fusiones A, B, C, D y E. No se muestran todos los datos debido al gran número de clones de anticuerpos que fueron seleccionados. Sólo se seleccionaron los clones de anticuerpos que demostraron la velocidad de disociación de la unión superior (kd $<10^{-4}$ 1/s) contra proteínas PAI-1 humana y de cyno para el análisis cromogénico funcional.

Tabla 5: Escrutinio de Afinidad/Velocidad de Disociación de la Unión del Sobrenadante de Hibridoma a PAI-1 Humano en Análisis Biacore

	Union a hPAI-1				Unión a hPAI-1		
CLON	**Unión**	**Constante de disociación <= 10^{-4}**	**PAI-1 de cyno**	**CLON**	**Unión**	**Constante de disociación <= 10^{-4}**	**PAI-1 de cyno**
A9	ND	ND	ND	**C26**	+	-	-
A20	+	-	-	**C45**	+	+	+/-
A37	+	-	-	**C46**	+	+	+
A39	+	+	-	**C49**	+	+/-	ND
A41	ND	ND	ND	**C61**	+	+/-	+/-
A44	+	+	+	**C66**	+	-	-
A47	+	+	+	**C69**	+	+	+/-
A52	ND	ND	ND	**C76**	ND	ND	ND
A71	+	+	+	**C79**	+	-	-
A75	+	+/-	+/-	**C85**	ND	ND	ND
A83	+	+/-	-	**C109**	+	-	-

A89	+	+/-	-	**C118**	+	+/-	ND
A93	+	+/-	-	**C134**	ND	ND	ND
A98	+	-	-	**C145**	+	-	+/-
A99	+	+	+/-	**D4**	-	-	-
A105	+	+	+	**D12**	+	-	-
A107	+	-	-	**D13**	-	-	ND
A113	+	+	+	**D15**	-	-	ND
A119	+	+/-	+/-	**D31**	+	-	-
B16	ND	ND	ND	**D33**	+	+/-	-
B18	+	-	-	**D37**	+	-	-
B28	+	+	-	**D48**	+	+	+/-
B29	+	-	-	**D52**	+	+	+
B32	+	+	+	**E4**	+	+	-
B58	+	+	-	**E5**	+	+	-
B85	ND	ND	ND	**E11**	+	+	-
B89	+	+	+/-	**E16**	+	+	+/-
B99	+	-	+/-	**E20**	+	ND	ND
B105	+	+	+/-	**E21**	+	+	-
B109	+	+	+				
B118	ND	ND	ND				

"+" = representa unión positiva a h/cPAI-1 o una constante de disociación de menos de o igual a 10^{-4}

"+/-" = representa unión parcial a h/cPAI-1 o una constante de disociación ligeramente superior a 10^{-4}

"-" = representa unión baja o no unión a h/cPAI-1 o una constante de disociación superior a 10^{-4}

ND = no determinado

Ejemplo 4: ELISA Funcional para Escrutinio de Sobrenadantes de Hibridomas para Seleccionar Anticuerpos que bloquean la Interacción de PAI-1 con tPA

Para permitir la selección de anticuerpos funcionales, se desarrolló un ELISA novedoso para permitir distinguir entre anticuerpos que solo se unen a PAI-1 en comparación con aquellos anticuerpos que bloqueaban la función de PAI-1 como inhibidor de tPA (ELISA funcional).

Los sobrenadantes de hibridomas se escrutaron en un ELISA funcional novedoso para identificar sobrenadante de hibridoma de diferentes clones que tienen la capacidad de bloquear la interacción tPA-PAI-1. El diseño del ELISA funcional es el siguiente: (1) si el anticuerpo se une a PAI-1 pero la unión del anticuerpo no bloquea la formación del enlace covalente entre PAI-1 y tPA, el anticuerpo anti-tPA se unirá al tPA que está unido a la placa a través de PAI-1 y da una lectura positiva; (2) si el anticuerpo bloquea PAI-1 y de este modo bloquea la interacción con tPA ya sea cambiando conformación de PAI-1 o mediante impedimento estérico, el anticuerpo anti-tPA no será capaz de unirse a la placa y lectura será negativo (DO 405 inferior). En paralelo, los sobrenadantes de hibridoma se sometieron a ensayo para determinar la unión a PAI-1 en el ELISA descrito en el Ejemplo 2. Puesto que la cantidad de anticuerpo en el sobrenadante del hibridoma es desconocida, se consideró que una lectura más baja que el control (es decir, por debajo de la lectura de control de isotipo) identificaba un anticuerpo de interés. Debido a la concentración de anticuerpo variable en el sobrenadante, el bloqueo en algunos casos solo fue parcial.

Se incubaron placas recubiertas con estreptavidina (NUNC Núm. 436014) durante 2 horas a temperatura ambiente con 2 ug/ml de biotina-PAI-1 (PAI-1 humano que tiene el N-terminal de la biotina marcado, fracción activa; Molecuiar Innovations Núm. Cat. NTBIOPAI-A) en BSA al 1%/PBS a 50 ul/ml. Las placas se bloquearon 1 hora con 200 ul de BSA al 1%/PBS a temperatura ambiente y se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Se añadieron a los pocillos diluciones de anticuerpo purificado y sobrenadantes de hibridoma a 50 ul/pocillo y se incubaron durante 15 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Dos cadenas de tPA (Innovative Research Núm. HTPA-TC) a 1 ug/ml se añadieron a las placas a 50 ul/pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Se añadieron a las placas anticuerpos anti-tPA conjugados con HRP (Life Span Technologies, Núm. Cat. LS-C39721) a una dilución 1:3000 y se incubaron durante 45 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Se añadió a las placas sustrato ABTS (una pastilla disuelta en 5 ml; Roche Diagnostics Núm. 11 204 521 001) a 50 ul/pocillo y se dejó el tiempo para desarrollar color. Las placas se leyeron en el aparato BioTek Synergy HT utilizando DO_{405}. Las DO con los valores son más bajos que el control de isotipo de IgG indican bloqueo de la unión de tPA a PAI-1.

En algunos casos el ELISA funcional se realizó antes del escrutinio de sobrenadante Biacore y sirvió como una etapa de selección que era más importante para el desarrollo de hibridoma. Una curva de representación con 33H1 como control positivo,

IgG1 como control negativo y A44 como un clon de anticuerpo positivo identificado se muestra en la Figura 3.

Tabla 6: ELISA Funcional para el Escrutinio de Sobrenadantes de Hibridoma para Seleccionar Anticuerpos que Bloquean la Interacción de PAI-1 con tPA

CLON	ELISA PAI-1	Inhibición de la Unión tPA/PAI-1	Selec-cionado	CLON	ELISA PAI-1	Inhibición de la Unión tPA/PAI-1	Selec-cionado
A9	+	-	no	**C26**	+	+	si
A20	+	-	no	**C45**	+	+	si
A37	+	+	si	**C46**	+	-	no
A39	+	+/-	si	**C49**	+	-	no
A41	+	+	si	**C61**	+	+	si
A44	+	+	si	**C66**	+	+	si
A47	+	+	si	**C69**	+	+	si
A52	+	-	no	**C76**	+	-	no
A71	+	+	si	**C79**	+	+	si
A73	+	-	no	**C85**	+	-	no
A75	+	+	si	**C109**	+	+	si
A83	+	+	si	**C118**	+	+	si
A89	+	+	si	**C134**	+	-	no
A93	+	-	no	**C145**	+	+	si
A98	+	+	si	**D4**	+	-	no
A99	+	-	no	**D12**	+	+	si
A105	+	+	si	**D13**	+	+	si
A107	+	+	si	**D15**	+	+	si
A113	+	+	si	**D31**	+	+	si
A119	+	+	si	**D33**	+	+	si
B16	+	-	no	**D37**	+	+	si
B18	+	+	si	**D44**	+	+	si
B28	+	+/-	si	**D47**	+	+	si
B29	+	+	si	**D48**	+	+	si

B32	+	+	si	**D52**	+	+	si
B58	+	+	si	**D55**	+	+	si
B85	+	-	no	**E4**	+	-	no
B89	+	+	si	**E5**	+	-	no
B99	+	+	si	**E11**	+	+	si
B105	+	+	si	**E16**	+	+	si
B109	+	+	si	**E20**	+	-	no
B118	+	+	si	**E21**	+	+	si

ELISA PAI-1 = a “+” representa unión a PAI-1 (véase el Ejemplo 2)

Inhibición de la Unión tPA/PAI-1 = un puntuación “+”representa que la interacción de tPA con PAI-1 es inhibida; +/- = inhibición parcial de la interacción de tPA con PAI-1

Se escrutaron más de 200 sobrenadantes. La Tabla 6 muestra una selección de sobrenadantes de hibridoma positivos y negativos. Aproximadamente 10 hibridomas por fusión mostraron capacidad para bloquear la unión de PAI-1 a tPA en el ELISA funcional. Basándose de los datos de los sobrenadantes de hibridoma, se seleccionaron hibridomas para la secuenciación y la producción de anticuerpos a media escala. A pesar de que D4 no se unió bien a PAI-1 no glicosilada, se seleccionó para la purificación y secuenciación basándose en su unión Biacore a PAI-1 glicosilado. Los anticuerpos purificados se caracterizaron adicionalmente en Biacore para determinar la cinética de afinidad, y en análisis cromogénicos y celulares para determinar la potencia en comparación con los anticuerpos disponibles comercialmente.

Ejemplo 5: Secuenciación por 5'-RACE (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc) y Purificación de Anticuerpos de Ratón

Los anticuerpos para una diana específica generados a partir de una serie de fusiones podrían tener las mismas secuencias. Mediante la realización de la secuenciación de genes de anticuerpos en una etapa temprana de generación de anticuerpos, se eliminaron anticuerpos posiblemente redundantes cualesquiera y las correctas secuencias de genes de anticuerpos guiaron selección y la humanización de los anticuerpos así como la construcción del anticuerpo quimérico.

5'-RACE es un procedimiento para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos a partir de un molde de ARN mensajero entre un sitio interno definido y secuencias desconocidas en el extremo 3' o 5' del ARNm. Esta metodología de amplificación con especificidad unilateral se ha descrito como PCR "unilateral" o PCR

"anclada". La secuencia de anticuerpo anti-PAI-1 humano murino variable original del anticuerpo principal se determinó mediante secuenciación de ADNc 5'-RACE y se confirmó mediante secuenciación N-terminal de la proteína.

Para determinar secuencias de IgG de cadena pesada (VH) y ligera (VL) variables, el ARN total de las células de hibridoma se aisló utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Núm. Cat. 74104) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células (5 x 10^6 células) se lisaron en 350 ul de tampón RLT del kit seguido por la captura de los ARN totales en columna de centrifugación. El ARN se eluyó en tampón TE del kit y se almacenó en hielo.

Se preparó ADNc de primera línea utilizando kit de amplificación de ADNc RACE SMARTer™ (ClonTech, Núm. Cat. 634923). El protocolo de 5 '-RACE se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ADNc de las cadenas VH y VL se amplificaron separadamente por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores 5' suministrados con el kit SMARTer™ y los cebadores específicos del gen de VH y VL 3' se enumeran a continuación:

Cadena Pesada Cebador 3': 5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA -3' (SEQ ID NO: 105)

Cadena Ligera Cebador 3': 5'-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAG -3' (SEQ ID NO: 106)

Los genes VH y VL amplificados se clonaron separadamente en un vector TOPO utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Núm. Cat. K4520-01). Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para transformar bacterias, se añadieron las mezclas de reacción a las células competentes de E. coli y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Los tubos, que contenían las células de E. coli y la mezcla de reacción, se calentaron a 42°C durante 40 segundos y se añadieron 250 microlitros de medio SOC de lit. Después de incubar la E. coli a 37°C durante 60 minutos con agitación a 300 rpm, las bacterias se extendieron sobre una placa de agar LB que contenía 100 microgramos por ml de ampicilina, seguido de incubación a 37°C, durante la noche.

Después de la confirmación de los genes VH y VL insertado mediante PCR, se seleccionaron cinco clones bacterianos y se propagaron en caldo LB que contenía 100 microgramos por ml de ampicilina para la preparación de ADN plasmídico. Los ADN plasmídicos se aislaron utilizando QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Núm. Cat. 27104) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los genes de IgG de VH y VL de los hibridomas se secuenciaron mediante el método de Sanger y las CDR se determinaron

utilizando la definición de Contacto (MacCallum *et al.*).

Los anticuerpos monoclonales se produjeron en matraces de biorreactor CELLine (Wilson Wolf Manufacturing Corp.; Núm. car. CL350 o Núm. Cat. CL1000) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en medio libre de suero (Gibco Núm. Cat. 12045) y se purificaron mediante cromatografía de Proteína A/G (GE Healthcare Life Sciences, Núm. Cat. 28-4083-47 y Núm. 28-4082-53). Los anticuerpos purificados se caracterizaron adicionalmente en Biacore para determinar la cinética de afinidad, y en análisis cromogénicos y celulares para determinar la potencia en comparación con los anticuerpos disponibles comercialmente.

Ejemplo 6: Análisis cromogénico funcional utilizando anticuerpo purificado

Los anticuerpos purificados se sometieron a ensayo en un análisis cromogénico para determinar la capacidad de bloquear PAI-1. PAI-1 inhibe la función de tPA, por lo tanto, los anticuerpos que bloquean PAI-1 darán como resultado la restauración de la función de tPA. Los análisis cromogénicos utilizan enzimas proteolíticas que actúan sobre sus sustratos naturales (proteínas y péptidos) mediante hidrólisis de uno o más enlaces peptídicos. Este proceso suele ser altamente específico en el sentido de que solo se escinden los enlaces peptídicos adyacentes a ciertos aminoácidos. Los sustratos cromogénicos son péptidos que reaccionan con enzimas proteolíticas que dan como resultado la formación de color que es cuantificable. Los sustratos cromogénicos se preparan sintéticamente y están diseñados para poseer selectividad similar a la del sustrato natural para la enzima. Anclado a la porción peptídica del sustrato cromogénico está un grupo químico que cuando se libera después de la escisión de la enzima da lugar a color. El cambio de color puede seguirse espectrofotométricamente y es proporcional a la actividad proteolítica.

Se utilizó un análisis cromogénico para confirmar la capacidad del anticuerpo para neutralizar la función de PAI-1 como un inhibidor de tPA. El tPA es capaz de liberar pNA desde el sustrato cromogénico S2288. S228 en solución no tiene color, pero después de haber sido expuesto a tPA y de la posterior liberación de pNA, la solución desarrolla un color amarillo que se puede leer a DO_{405}. La formación de color se puede observar durante 2-3 horas para determinar la cinética de la reacción enzimática. El PAI-1 es capaz de bloquear la actividad enzimática de tPA de una manera dependiente de la concentración.

Se realizó un análisis cromogénico de dos etapas. Todos los reactivos están en concentración 10x hasta la etapa en la que añadieron a la solución de sustrato. En la

primera etapa, se midió la potencia de PAI-1 en la inhibición de tPA utilizando el análisis cromogénico (titulación PAI-1 con concentración de tPA fija). La curva de titulación de PAI-1 se analizó para determinar la CI50 para PAI-1 que bloquea la actividad de tPA. Después, se seleccionó la CI80 calculada a partir de la curva para interrogación de anticuerpos adicional para determinar la capacidad de neutralizar la función de bloqueo PAI-1 y restaurar la actividad enzimática de tPA. Se combinaron volúmenes iguales (25 ul) de tPA (a 14 nM) (Innovative Research, Núm. Cat. IHTPA-TC) y PAI-1 humano glicosilado (forma activa) (Molecular Innovations, Núm. Cat. GLYHPAI-A) o PAI-1 de ratón no glicosilado (activa forma) (Molecular Innovations Núm. Cat. IMPA1) y se incubaron utilizando diluciones seriadas 1:3 de PAI-1 partiendo de 10^8 nM y concentración fija de tPA. Todas las diluciones de proteínas se elaboraron con BSA al 1%/PBS. La mezcla se incubó en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron a los pocillos 200 ul de sustrato cromogénico S2288 (1,25 mM) (Chromogenix, Núm. Cat. S-820852) diluido de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se registraron el cambio de absorbancia mediante DO_{405} a 405 nm durante 2 horas cada 10 minutos para medir la actividad tPA residual. Para los controles, se midió el fondo en ausencia de tPA (sin reacción enzimática), un control positivo no fue PAI-1 (100% de actividad tPA) y un control negativo fue PAI-1 en exceso de 10 veces de tPA (bloqueo completo de actividad tPA). Véase la Figura 4 para las curvas representativas de 33B8, A44, 33H1 e IgGl.

Para la segunda etapa, las propiedades funcionales de los anticuerpos se determinaron mediante la evaluación de su capacidad para inhibir PAI-1 activo y restaurar la función de tPA utilizando el análisis de neutralización de PAI-1. Para esta etapa, se incubó PAI-1 activo 12,5 ul (a 56 nM) con un volumen igual de PBS (Invitrogen, Núm. Cat. 14190-344) que contenía BSA al 1% (Sigma, Núm. Cat. A3059) o con diluciones seriadas 1:3 de anticuerpo partiendo de 2 uM. Los anticuerpos de control y desconocidos se incubaron a concentraciones (diluciones 1:5) que oscilaban de 0,1 a 300 nM con PAI-1 3 nM y se añadió tPA a la mezcla. Todos los ingredientes se incubaron a una concentración 10x a temperatura ambiente y se diluyeron adicionalmente 10 veces con sustrato tPA S2288 que después de la escisión por tPA cambia de color de transparente a amarillo. Las muestras se leyeron a DO 405 durante 2 horas cada 10 minutos a 37°C. La mezcla se dejó reaccionar en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente para lograr la formación del complejo anticuerpo-antígeno. A continuación se añadieron 25 ul de tPA (a 14 nM que corresponde a la inhibición CI_{80} de la actividad de tPA) a los pocillos y se incubaron durante 15 minutos a

temperatura ambiente. Por último, se añadieron a la mezcla 200 ul de sustrato S2288 1,25 mM diluido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se registró el cambio de absorbancia a 405 nm para medir la actividad de tPA residual durante 2 horas cada 10 min. El cien por ciento de actividad de PAI-1 se define como la actividad de PAI-1 observada en ausencia de anticuerpo. La neutralización de la actividad de PAI-1 por el anticuerpo se calcula a partir de la actividad residual de PAI-1 medida en presencia del anticuerpo. Los controles fueron IgG1 como un control de isotipo (negativo) y mAb 33H1 y mAb 33B8 como controles positivos. Véase la Figura 5 para las curvas representativas de B28, E16, E21, A75 e IgG1.

Los ortólogos de PAI-1 humano que inhiben tPA humano se sometieron a ensayo en el sistema de análisis cromogénico de dos etapas. La titulación de ortólogos se realizó como se ha descrito anteriormente para PAI-1 humano (véase la Figura 6 para las curvas representativas de las titulaciones) y la actividad tPA se determinó mediante el método cromogénico (véase la Figura 7 para las curvas de representación para 33B8 y A44 contra PAI-1 de cyno y de ratón). La concentración final de tPA humano utilizado en el análisis fue 1,4 nM. Se incubaron 12,5 ul de PAI-1 activo (56 nM) con un volumen igual de PBS que contenía BSA al 3% o con diluciones seriadas 1:3 de anticuerpo partiendo de 2 uM. La mezcla se dejó reaccionar en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron a los pocillos 25 ul de tPA (14 nM) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar la reacción se añadieron a la mezcla 200 ul de sustrato S2288 de tPA (Chromogenix) (1,25 mM). El PAI-1 ortólogo se obtuvo de Molecular Innovations: PAI-1 de ratón (fracción activa de tipo salvaje; Núm. Cat. MPAI); PAI-1 de rata (fracción activa de tipo salvaje; Núm. Cat. RPAI); y PAI-1 de conejo (mutante estable; Núm. Cat. RbPAI-191L) PAI-1 de cyno (PAI-1 activo de cyno) fue de producción propia en E. coli. Debido a las malas constantes de disociación de los ortólogos de conejo y rata en el escrutinio Biacore (datos no mostrados), no se realizó el escrutinio de los anticuerpos contra estos ortólogos.

Tabla 7: Actividad de los Anticuerpos contra Ortólogos y Estados de Glicosilación de PAI-1 en el Análisis Cromogénico Funcional

ID Clon	Isotipo	Ortólogo de PAI-1 y Estado de Glicosilación			
		hPAI-1 no gli	hPAI-1 gli	cPAI-1 no gli	mPAI-1 no gli
A37	IgG1	+/-	-	-	-
A39	IgG1	-	+++	-	-
A41	IgG1	+/-	-	-	-
A44	IgG1	+++	+++	+++	-
A47	IgG1	nd	-	-	-
A71	IgG1	+++	+++	+++	-
A75	IgG2a	+++	+++	+++	-
A83	IgG1	nd	+/-	+/-	-
A89	IgG2b	-	-	-	-
A98	IgG1	nd	nd	nd	nd
A105	IgG1	+++	+++	+++	-
A107	IgG1	+/-	-	-	-
A113	IgG1	-	-	-	-
A119	IgG2a	-	-	-	-
B18	IgG1	+	+	+	-
B28	IgG2b	-	+++	-	-
B29	IgG1	-	-	-	-
B32	IgG1	nd	-	-	-
B58	IgG1	nd	+	+	-
B89	IgG1	nd	-	-	-
B99	IgG2a	nd	+	+	-
B105	IgG1	-	-	-	-
B109	IgG1	+++	+++	+++	-
B118	IgG1	+	+	+	-
C26	IgG1	++	++	++	+
C45	IgG2b	+++	+++	+++	-
C61	IgG1	+	+	+	-
C66	IgG1	+	+	+	-

C69	IgG1	++	++	++	-
C79	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C109	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C118	IgG1	++	++	++	-
C145	IgG2b	++	++	++	-
D4	IgG2a	+	++	+	-
D12	IgG1	+	+	+	-
D13	IgG1	-	-	-	-
D15	IgG1	+	+	+	-
D31	IgG1	++	++	++	-
D33	IgG1	-	-	-	-
D37	IgG2a	-	-	-	-
D48	IgG2a	-	+/-	-	-
D52	IgG1	+	+	+	-
E11	IgG1	++	++	++	-
E16	IgG1	+++	+++	+++	-
E21	IgG2b	+++	+++	+++	-
h=humano, c=mono cinomolgo, m=ratón, nd=no determinado "-"=sin actividad, "+/-"=actividad parcial' "+"=actividad ligera, "++"=actividad moderada, "+++"=actividad fuerte					

Uno o más anticuerpos de cada fusión demostraron capacidad para bloquear la función inhibidora tanto de cyno como de PAI-1 humano en este análisis, teniendo aproximadamente 14 anticuerpos una actividad de bloqueo de moderada a fuerte. A39 y B28 tenían un perfil único ya que estos dos anticuerpos bloquearon hPAI-1 glicosilado, pero no tenían actividad contra PAI-1 no glicosilada humana o de cyno. Ninguno de los anticuerpos fueron capaces de bloquear de manera eficiente la actividad de PAI-1 de ratón (en menos de 10 veces del PAI-1 humano) a excepción de C26.

Ejemplo 7: Mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden inhibir PAI-1 por tres mecanismos diferentes: a) mediante impedimento estérico, b) mediante la conversión de PAI-1 a una conformación latente tras la unión, y c) mediante la conversión de PAI-1 a un sustrato para la conformación tPA en lugar del inhibidor ("conformación de sustrato"). El PAI-1

produce un enlace covalente con tPA tras la interacción con la serina proteasa.

Se utilizaron las técnicas de análisis cromogénico y SDS-PAGE para identificar el mecanismo de acción del anticuerpo. Se llevó a cabo una reacción entre el anticuerpo monoclonal (o anticuerpos de control), PAI-1 y tPA como se ha descrito anteriormente para el análisis cromogénico funcional. Las muestras se mezclaron con tampón de muestra de Laemmli y se cargaron en gel de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y se hicieron correr durante 30 minutos. Después de eso, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para visualizar las proteínas, los complejos y la forma escindida de PAI-1. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de control con mecanismo de acción conocido como comparadores. Se sabe que 33B8 convierte PAI-1 a una conformación latente y se sabe que 33H1 convierte PAI-1 a una conformación de sustrato. Este análisis podría identificar positivamente la conformación de sustrato, pero fue incapaz de distinguir entre la conformación latente o el impedimento estérico. Los geles de SDS representativos se muestran en las Figuras 8, 9 y 10.

Tabla 8: Mecanismo de Acción de Anticuerpos Monoclonales

Anticuerpo	**Mecanismo de Acción**
A44	Convierte PAI-1 de Activo → Conformacion de Sustrato
C26	Convierte PAI-1 de Activo → Conformacion de Sustrato
C45	Convierte PAI-1 de Activo → Conformacion de Sustrato
E21	Convierte PAI-1 de Activo → Conformacion de Sustrato
A39	Convierte PAI-1 de Activo → Conformación Latente o Impedimento Estérico
B109	Convierte PAI-1 de Activo → Conformación Latente o Impedimento Estérico
E16	Convierte PAI-1 de Activo → Conformación Latente o Impedimento Estérico

A44, C26, C45 y E21 bloquean la actividad de PAI-1 convirtiendo PAI-1 de la conformación activa a la conformación de sustrato. A39 y B109 tienen un mecanismo de acción diferente, pero el análisis fue incapaz de distinguir si estos anticuerpos bloqueaban la actividad de PAI-1 cambiando PAI-1 de la conformación activa a la conformación latente o mediante impedimento estérico.

Ejemplo 8: Cinética de Unión de los Anticuerpos Purificados

En la medición de la cinética, los anticuerpos se evaluaron a la inversa a 25°C. En

el análisis inverso, las anticuerpos PAI-1 fueron capturados en la superficie para el anticuerpo anti-Fc de IgG de ratón preparada en el chip CM5 seguido de la inyección de las diluciones seriadas 2x de las proteínas PAI-1 (humana o de cyno) partiendo de 40 nM. Se eligió una alta velocidad de flujo a 50 ul/min para evitar la limitación del transporte masivo. Se permitieron 2.000 segundos de tiempo de disociación para acomodarse a la lento velocidad de disociación de los anticuerpos seleccionados. El chip se regeneró mediante tampón de glicina-HCl, pH 1,7 después de cada ronda de unión anticuerpo-PAI-1. Se realizó el análisis de datos cinéticos utilizando el soporte lógico Biacore BIAevaluation. Los sensogramas fueron referenciados por duplicado restando los valores de la celda de flujo de referencia y los valores del tampón del blanco. Los sensogramas se ajustaron utilizando el modelo de cinética simulada 1:1 (Langmuir) con Rmax local. Los datos para los anticuerpos sometidos a ensayo se muestran a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9: Cinética de Unión mediante Análisis Inverso Biacore

Anticuerpo	PAI-1 humano		PAI-1 de cyno	
	Velocidad de Disociación kd (1/s)	Afinidad KD (M)	Velocidad de Disociación kd (1/s)	Afinidad KD (M)
A39	7,09E-05	1,16E-11	ND	ND
A44	1,49E-05	3,76E-12	<= 1,0E-6	<=1,0E-13
A75	4,76E-04	1,20E-10	ND	ND
A105	1,64E-04	4,23E-11	ND	ND
B28	4,61E-04	6,5E-10	ND	ND
ND = no determinado				

Se analizaron adicionalmente las cinéticas de unión de anticuerpos representativos y se comparados en un análisis Biacore directo con complejo de vitronectina y PAI-1. En el análisis directo, la proteína vitronectina humana se inmovilizó en el chip CM5 en las celdas de flujo Fc1-Fc4 mediante acoplamiento con amina. A continuación, PAI-1 humano fue capturado en la superficie de la vitronectina en celdas de flujo Fc2-FC4 como ligando. Fc1 fue reservada como celda de referencia. Los anticuerpos se diluyeron 2x partiendo de 40 nM y se inyectaron en Fc1-4. Se realizó el análisis de datos cinéticos utilizando el soporte lógico Biacore BIAevaluation. Los sensogramas fueron primero referenciados por duplicado restando los valores de la celda de referencia y los valores del tampón del blanco, y a continuación se ajustaron mediante el modelo 1:1

(Langmuir) con Rmax global.

Tabla 10: Cinética de unión de A44 a PAI-1 humano capturado con vitronectina en un análisis Biacore directo

unión de A44 a hPAI-1 capturado con Vn	kd (1/s)	KD (M)
	<= 1,0E-6	<=1,0E-12

Los datos de la Tabla 10 indican que A44 se une a PAI-1 humano libre así como a PAI-1 en el complejo con vitronectina.

Ejemplo 9: Análisis funcional en células humanas primarias

Para investigar adicionalmente la capacidad de cada anticuerpo para restablecer la producción de plasmina aguas abajo por las células humanas primarias, se utilizó un análisis de generación de plasmina. Solamente los anticuerpos que mostraron alta potencia en el análisis cromogénico y buena afinidad en Biacore se utilizaron y sometieron a ensayo en este análisis.

El día 1, se sembraron las células estrelladas hepáticas primarias humanas (Sciencell CA, Núm. Cat. SC5300) a 20000 células/pocillo en medio de inanición (DMEM Gibco + glutamax- 1 4,5 g/L de D-glucosa, piruvato (31966-021), Suero Bovino Fetal Gold PAA al 0,2% (A11-152)) a 37°C bajo CO2 al 5%. El día 2, para neutralizar la actividad de PAI-1, los anticuerpos se pre-incubaron con PAI-1 recombinante (Molecular Innovation, Núm. Cat. IGLYHPAI-A, PAI-1 humano Glicosilado recombinante, concentración final 5 nM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se incubó tPA (Molecular Innovations (Núm. Cat. HTPA-TC), 5 nM en DMEM sin rojo fenol) con las células durante 15 minutos a 37°C. Después de lavar el tPA no unido, se añadieron mezclas de PAI-1/mAb sobre las células y a continuación se midió la actividad de tPA residual añadiendo y mezcla de glu-Plasminógeno/Sustrato (Glu-Pg: Sigma Núm. Cat. 9001-91-6; concentración final 0,5 µM) y sustrato cromogénico de plasmina: (CBS00.65 Stago Núm. Cat. 00128, concentración final 0,5 mM).

La activación del plasminógeno a plasmina es detectada mediante la lectura de las cinéticas cada 45 segundos de A405/492 nm utilizando un espectrofotómetro (IEMS, Thermofischer) termostatizado a 37°C. El soporte lógico Biolise (Thermofischer) calcula la velocidad máxima de escisión del sustrato cromogénico: generación de plasmina expresada como Vmax: tasa máxima de A405/492 nm por minuto (mDO/min) calculada. La inhibición de PAI-1 se calcula a continuación con tPA solo como referencia (100% de inhibición) y PAI-1 (sin mAb, puesto que no hay inhibición) y se representó gráficamente utilizando el soporte lógico de velocidad Biostat para calcular CI_{50} e Imax.

Tabla 11: Generación de Plasminógeno en Células Estrelladas Hepáticas Primarias Humanas

Anticuerpo	CI_{50abs} media± etm (nM)	I_{max} media (%)	n
A44	3,32 ± 0,34	97	7
A39	5,4 ± 0,8	99	3
A71	8,61 ± 3,6	90	3
A75	22,6 ± 8,2	66	4
A105	27± 7,8	88	3
B28	7,28 ± 2,7	90	3
B109	6,11 ±0,88	94	3
C26	Inactivo	n/a	2
C45	6,5±1,11	97	4
E16	4,74 ± 2,27	95	3
E21	Inactivo	n/a	3
33H1	22,92 ± 12	56	3
33B8	Inactivo	n/a	3
n/a = no aplicable			

Ejemplo 10: Exploración del epítopo de unión a anticuerpo mediante análisis de competicion Biacore

Se exploró un grupo seleccionado de anticuerpos anti-PAI-I con actividades de unión y bloqueo superiores para determinar sus posibles epítopos de unión en análisis de competición Biacore. En los ensayos, se establecieron los anticuerpos recién identificados, así como varios anticuerpos anti-PAI-1 disponibles comercialmente con sitio de unión conocido en PAI-1 humano para competir por la unión a la proteína PAI-1 humana. Cada anticuerpo se inmovilizó sobre una celda de flujo en un chip Biacore CM5 utilizando la reacción de acoplamiento de amina convencional. Todos los anticuerpos sometidos a ensayo, excepto para el clon B28, conservaban la actividad del sitio de unión después del acoplamiento a la amina. La proteína PAI-1 humana fue capturada en el anticuerpo inmovilizado sobre el chip seguido de la inyección de cada anticuerpo como analito. Sólo los anticuerpos del analito que tienen diferentes sitios de unión en PAI-1 humano del anticuerpo inmovilizado mostrarán señales de unión adicionales en Biacore, Los experimentos de competición se repitieron dos veces para cada anticuerpo inmovilizado y los resultados se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 12: Resumen de los epítopos de unión del análisis de competición Biacore

	Anticuerpo del analito												
Anticuerpo inmovilizado		33H1	3 3B8	A44	31C9	A71	A75	B109	B28	C45	C26	E16	E21
	33H1	c/c	b/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/c
	33B8	b/b	c/c	b/b	b/c	b/b	b/b	b/b	p/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	A44	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	c/c	b/b
	31C9	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	A71	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	A75	b/b	p/p	b/b	p/p	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	B109	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/c	b/b
	B28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C45	b/b	p/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b
	C26	b/c	p/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/c	b/b	c/c	b/b	c/c
	E16	b/b	p/b	b/c	b/b	b/b	p/b	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	b/b
	E21	b/c	b/c	b/b	b/c	b/c	b/b	b/b	b/c	b/b	b/c	b/b	c/c
	p=unión parcial por el anticuerpo del analito, c=competición por el anticuerpo del analito, b=unión por el anticuerpo del analito;" – "= sin unión de PAI-1 al anticuerpo inmovilizado; nt = no sometido a ensayo												

Cuando A44 se inmoviliza y se une a PAI-1, C45 (anticuerpo del analito) es incapaz de unirse a PAI-1 que unido a A44. Por lo tanto, C45 compite por el mismo sitio de unión que se une a A44 en PAI-1 (indicado en la Tabla 12 como "c/c") o la unión de A44 a PAI-1 interfiere en la unión de C45 a PAI-1. Este análisis se confirma cuando el experimento se repite en el orden inverso. Específicamente, cuando C45 es el anticuerpo inmovilizado y está unido a PAI-1, A44 como anticuerpo del analito es incapaz de unirse a PAI-1 que está unido a C45 (indicado en la Tabla 12 como "c/c"). En un análisis similar, A71 y A75 compiten por el mismo sitio en PAI-1. El análisis Biacore confirmó que A44 y C45, así como A71 y A75, compiten con o interfieren entre sí cuando se unen a PAI-1.

Por el contrario, los anticuerpos disponibles comercialmente, 33H1 y 33B8, no compiten con A44. Cuando A44 es el anticuerpo inmovilizado y se une a PAI-1, tanto 33H1 y 33B8 son capaces de unirse todavía a PAI-1 que está unido a A44 (indicado como "b/b" en la Tabla 12). Esto se confirma en el experimento inverso. Cuando PAI-1 se une a 33H1 inmovilizado o 33H8 inmovilizado, A44 es todavía capaz de unirse a PAI-1. Por lo tanto, los anticuerpos comerciales 33H1 y 33B8 no compiten ni interfieren en la unión de A44 a PAI-1.

Curiosamente, algunos anticuerpos inmovilizados (es decir, B109) bloqueaban la unión del anticuerpo del analito (es decir, 33B8) a la proteína PAI-1 capturada; pero, al cambiar las posiciones del anticuerpo inmovilizado con respecto al anticuerpo del analito (por ejemplo, cambiando el par en el chip), el par de anticuerpos ya no competía por la unión entre sí a PAI-1. Por ejemplo, cuando B109 era el anticuerpo inmovilizado que se unía a PAI-1, 33B8 era incapaz de unirse PAI-1. Sin embargo, cuando 33B8 era el anticuerpo inmovilizado que se unía a PAI-1, B109 era capaz de unirse a PAI-1. Una posible explicación de este resultado es que cuando el anticuerpo inmovilizado se unía a PAI-1, PAI-1 podía desplazarse a una conformación desfavorable para el segundo o el anticuerpo del analito y evita la unión del anticuerpo del analito (por ejemplo, cuando B109 es el anticuerpo inmovilizado y 33B8 es el anticuerpo del analito). Sin embargo, cuando el par de anticuerpos se invierte, el anticuerpo de inmovilización puede unirse de una manera tal que la conformación de PAI-1 permanece relativamente sin cambios, permitiendo así que el anticuerpo del analito se una a al PAI-1 unido (es decir, el anticuerpo del analito B109 es capaz de unirse a PAI-1 que está unido al anticuerpo inmovilizado 33B8). Por lo tanto, la competición observada entre 33B8 y B109 no se debía a sitios de unión solapantes en PAI-1, si no que se debía probablemente a un cambio conformacional en PAI-1 cuando se unía a B109.

Otra observación interesante fue que B28 perdía la unión a PAI-1 humano cuando se inmovilizaba a través de acoplamiento de aminas, lo que sugiere que las regiones CDR de B28 implican aminoácidos con uno o varios grupos amina primarios.

Ejemplo 11: Selección de anticuerpo monoclonal de ratón para la humanización

La Tabla 13 muestra un resumen de los datos *in vitro* que caracterizan los anticuerpos monoclonales más activos de los cinco fusiones realizadas. Basándose en estos datos, A44 fue seleccionado para la humanización porque A44 era el anticuerpo más potente en el ensayo cromogénico y en la generación de plasmina, a la vez que tiene

la mayor afinidad en Biacore.

Tabla 13: Resumen de la afinidad del anticuerpo monoclonal y potencia contra PAI-1 glicosilado humano

Anticuerpo	Análisis cromogénico (nM)	Generación de plasmina (nM)	Afinidad Kd (M)	Mecanismo de acción
A39 (IgG1/k)	1,70, 1,00	5 ,4	1 ,16E-11	SH o latente
A44 (IgG1/k)	1,66, 1,50, 1,70	3 ,32	4 ,20E-14	sustrato
A71 (IgG1/k)	Aprox , 4 ,00	8 ,61	ND	SH o latente
A75 (IgG2a/k)	3,00	22 ,6	1 ,20E-10	SH o latente
A105 (IgG1/k)	7,00	27 ,0	4 ,20E-11	SH o latente
B28 (IgG2b/k)	1,80	7 ,28	6 ,5E-10	SH o latente
B109 (IgG1/k)	0,23	6 ,11	ND	SH o latente
C26 (IgG1/k)	5,00	Inactivo	ND	sustrato
C45 (IgG2b)	0,5	10 ,6	ND	sustrato
E16 (IgG1)	1,1	4 ,74	ND	SH o latente
E21 (IgG2b)	1,3	216 ,0	ND	sustrato
SH = impedimento estérico; ND = no determinado				

Las secuencias de cadena pesada y ligera mostradas en la Tabla 1 están alineadas en la Figura 12 y las CDR, como se define por IMGT, se resaltan en negrita. Basándose en los datos *in vitro* presentados en la Tabla 13, se seleccionó A44 para la humanización.

Ejemplo 12: Manipulación genética del Fab anti-PAI-1 A44: humanización, estabilización y mutación de motivos de secuencia no deseados

Se tomaron varias aproximaciones comentadas a continuación para humanizar, estabilizar y optimizar los motivos de secuencia del anticuerpo A44 murino contra PAI-1.

1) Humanización

El protocolo de humanización utilizado ha sido descrito en el documento

PCT/US08/74381 (US20110027266), incorporado a la presente memoria como referencia en su totalidad. Las secuencias ligera (VL) y pesada (VH) variables de A44 murino se utilizaron para construir un modelo de homología de cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de A44 anti-PAI-1en Molecular Operating Environment (MOE; v. 2010,10; Chemical Computing Group). Se utilizaron los siguientes moldes: marco de la cadena ligera - 1D5I (94% de identidad en las regiones marco), marco de la cadena pesada - 3KSO (96% de identidad en las regiones marco), L1 - 1D5I (94% de identidad), L2 - 1D5I (94 % de identidad), L3 - 1AXS (72% de identidad), H1 - 1IC7 (82% de identidad), H2 - 1MBU (68% de identidad) y H3 - 2WDB (62% de identidad). El bucle H3 fue particularmente difícil de modelar puesto que Trp es el primer residuo. 2WDB, aunque es un bucle más corto, también tiene un Trp en el inicio del bucle y la misma secuencia Phe-Asp-Tyr en el extremo del bucle H3. Las cadenas laterales de Glu-105 (LC) e His-99 se reconstruyeron y el modelo posterior se tuvo una energía minimizada utilizando los procedimientos convencionales implementado en MOE. Con posterioridad se realizó una simulación de la dinámica molecular (MD) del modelo de homología 3D minimizado del A44 murino, con limitaciones en la cadena principal de la proteína a una temperatura de 226,85°C durante 1,1 nanosegundos (ns) en disovente implícito Generalized Born. Se extrajeron diez diversas conformaciones de esta primera ronda de MD cada 100 picosegundos (ps) durante el último 1 ns. Estas diversas conformaciones fueron sometidas cada una a continuación a una simulación MD, sin limitaciones en la cadena principal de la proteína y a 26,85°C de temperatura, durante 2,3 ns. Para cada una de las 10 rondas de MD, se utilizaron las últimas 2.000 instantáneas, una cada ps, de la trayectoria MD para calcular, para cada ácido amino A44 murino, su desviación de la raíz cuadradas media (rmsd) en comparación con una posición medioide de referencia. Al comparar la rmsd promedio en las 10 rondas de MD separadas de un aminoácido dado con la RMSD promedio global de todos los aminoácidos murinos A44, se decide si el aminoácido es lo suficientemente flexible, como se observa durante la MD como para ser considerado como probabilidades de interaccionar con los receptores de células T y responsable de la activación de la respuesta inmunitaria. Se identificaron 37 aminoácidos como flexibles en el anticuerpo murino A44, excluyendo las CDR y los 5Å más inmediatos.

El movimiento de los 62 aminoácidos de A44 murino más flexibles, durante los 20 ns (10 x 2 ns), se comparó a continuación con el movimiento de los correspondientes aminoácidos flexibles de 49 modelos de homología de la línea germinal humana, para cada uno de los cuales se realizan 10 simulaciones MD x 2 ns. Los 49 modelos de la línea germinal humana fueron construidos combinando sistemáticamente las 7 cadenas ligeras

de la línea germinal humana más comunes (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) y 7 cadenas pesadas de la línea germinal humana más comunes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). El anticuerpo de la línea germinal humana vk1-vh2 mostró una similitud 4D de 0,58 de sus aminoácidos flexibles en comparación con los aminoácidos flexibles del anticuerpo murino A44; el anticuerpo de la línea germinal vk1-vh2 se utilizó por lo tanto para humanizar el anticuerpo A44 centrándose en los aminoácidos flexibles. La línea germinal vlambda3-vh4 humana mostró la segunda mayor similitud 4D, 0,57, y también fue utilizado como base para la humanización del anticuerpo A44. Para la asociación de aminoácidos por parejas entre A44 murino y los aminoácidos vk1-vh2, se alinearon las 2 secuencias basándose en la superposición óptima 3D de los carbonos alfa de los 2 modelos de homología correspondientes. La asociación de aminoácidos por pares entre A44 murino y vlambda3-vh4 se realizó de una manera similar. La figura 13 muestra el alineamiento de la cadena ligera de A44 murino con vk1 y vlambda3. La figura 14 muestra el alineamiento de la cadena pesada de A44 murino con vh2 y vh4.

2) Estabilización

a) Enfoque basado en el conocimiento

Los aminoácidos de las cadenas ligera y pesada con baja frecuencia de aparición vs. sus respectivas secuencias canónicas, excluyendo las CDR, se propusieron para ser mutados en los aminoácidos más frecuentemente encontrados ($\Delta\Delta G_{th}$ > 0,5 kcal/mol; (E. Monseilier, H, Bedouelle, J. Mol. Biol. 362, 2006, págs. 580-593)). Esta primera lista de mutaciones consenso para LC y HC se ha restringido a los aminoácidos encontrados en la línea germinal humana más próxima (vk1-vh2). Los cambios sugeridos en las inmediaciones de las CDR (zona "Vernier" 5 Angstrom (J. Mol. Biol. 224, 1992, págs. 487-499)) fueron retirados de consideración. Esto dio lugar a dos mutaciones estabilizadoras en la LC (véase la Tabla 15) y cinco mutaciones estabilizadoras en la HC (véase la Tabla 16). Se tomaron en cuenta otros criterios para considerar estas mutaciones para estabilizar potencialmente el anticuerpo anti-PAI-1 A44. Estos criterios supusieron un cambio favorable en la hidropatía en la superficie o en la mecánica molecular basada en la estabilización pronosticada del mutante. Además, se informó en la bibliografia de que las mutaciones estabilizadoras adicionales resultaban satisfactorias (E. Monseilier y H. Bedouelle, J. Mol. Biol., 362, 2006, págs 580-593; B J. Steipe et al. J. Mol Biol., 1994, 240, 188-192) y se tuvieron en cuenta (véanse las Tablas 17 y 18), sin embargo, no se sugirieron mutaciones adicionales.

Tabla 15: Cambios estabilizadores propuestos en la cadena ligera

Residuo	Cambio Propuesto	ΔΔGth Calculado	Cambio aceptado
Lys-3	Val	2,23998	No – no en la línea germinal
Met-11	Leu	0,766432	Ya cambiado en la humanización
Tyr-12	Ser	2,04389	Ya cambiado en la humanización
Leu-36	Val	2,17091	No - Vernier
Lys-42	Gln	0,939652	No – no en la línea germinal
Thr-46	Leu	2,01966	No - Vernier
Gln-69	Thr	2,16357	No - Vernier
Tyr-80	Ala	2,92454	Ya cambiado en la humanización
Met-83	Leu	2,57007	Ya cambiado en la humanización
Gly-84	Ala	0,597822	Si
Ile-85	Thr	1,27255	Si

Tabla 16: Cambios estabilizadores propuestos en la cadena pesada

Residuo	**Cambio propuesto**	**ΔΔGth Calculado**	**Cambio aceptado**
Glu-1	Gln	0.562423	S
Met-2	Val	3.41361	No – Vernier
Glu-6	Gln	0.655069	No – No en la línea germinal
Pro-9	Ala	0.505324	No – No en la línea germinal
Ser-10	Glu	2.40018	Ya cambiado en la humanización
Gln-16	Ala	1.11244	No – No en la línea germinal
Thr-17	Ser	1.79135	No – No en la línea germinal
Leu-18	Val	0.760243	No – No en la línea germinal
Ser-19	Lys	1.20539	No – No en la línea germinal
Thr-21	Ser	1.3289	No – No en la línea germinal
Ser-23	Lys	1.82798	No – No en la línea germinal
Val-24	Ala	1.35286	No – No en la línea germinal
Thr-25	Ser	1.72008	Si
Ile-37	Val	1.66985	No – No en la línea germinal
Arg-38	Lys	0.568427	No – No en la línea germinal
Lys-39	Gln	2.27769	Si
Phe-40	Arg	1.81199	No – No en la línea germinal
Asn-43	Lys	1.42568	Ya cambiado en la inmunización

Lys-44	Gly	2.01606	Ya cambiado en la inmunización
Tyr-47	Trp	2.62805	No – Vernier
Met-48	Ile	1.67766	No – Vernier
Pro-61	Glu	1.08569	No – No en la línea germinal
Ser-62	Lys	0.840485	No – No en la línea germinal
Leu-63	Phe	1.25428	No – No en la línea germinal
Arg-66	Lys	0.528008	No – No en la línea germinal
Ile-67	Ala	1.93707	No – Vernier
Ser-68	Thr	1.36475	Si
Ile-69	Leu	0.550185	No – Vernier
Arg-71	Val	0.61536	No – Vernier
Asn-72	Asp	3.40632	Si
Thr-73	Lys	0.5597	No – Vernier
Lys-75	Ser	0.81321	No – No en la línea germinal
Asn-76	Ser	0.744463	No – No en la línea germinal
Gln-77	Thr	1.30652	No – No en la línea germinal
Tyr-78	Ala	2.54699	No – Vernier
Val-85	Leu	1.71111	No – No en la línea germinal
Thr-87	Ser	1.30394	No – No en la línea germinal
Thr-90	Ser	0.557686	No – No en la línea germinal
Thr-92	Val	1.13795	No – No en la línea germinal

Tabla 17: Combinaciones de las mutaciones estabilizadoras evaluadas

Combinación*	**Cambios adicionales sugeridos**	**Cambio aceptado**
L1 (40->P y 42->Q)	Ninguno – ni cambiado	Sin cambios
L2 (45->K)	Ninguno – ya K45	Ninguno
L3 (74->T)	Ninguno – ya T74	Ninguno
L4 (76->S)	Ninguno – ya S76	Ninguno
L5 (84->A, 85->T)	Ninguno – ya cambiado en la estabilización	Ninguno
H1 (15->G)	Ninguno – no en la línea germinal	Ninguno
H2 (61->E, 62->Lys, 63->Phe)	Ninguno en la línea germinal	Ninguno
H3 (86->T, 87->S, 88->E)	87 y 88 no en la línea germinal	Ninguno
S1 (L1 y L5)	Ninguno	No
S2 (H1 y H3)	Ninguno	No
*Nota: Numeración sucesiva utilizada para hacer referencia a residuos		

Tabla 18 *: Mutaciones estabilizadoras evaluadas

Residuo de cadena ligera*	**Cambios adicionales sugeridos**	**Cambio aceptado**
15->L	V15->L	No – V15 in Vk1 germline
90->Q	Ninguno – ya Q90	Ninguno
32->Y	Ninguno – ya Y32	Ninguno
106->I	Ninguno – ya I106	Ninguno
63->S	Ninguno – ya S63	Ninguno
21->I	Ninguno – ya M21	Ninguno
*Nota: Numeración sucesiva utilizada para hacer referencia a residuos		

b) Enfoques basados en 3D y MD

Se ha informado previamente sobre enfoques basados en 3D y MD (Seco J., Luque F.J., Barril X., J. Med. Chem. 23 Abril 2009:52(8): 2363-71; Malin Jonsson et al, J. Phys. Chem. B 2003, 107:5511- 5518). Las regiones hidrófobas del anticuerpo fueron

identificadas explícitamente por el análisis de simulación de la dinámica molecular del Fab en un disolvente binario (isopropanol en agua al 20%, 20 ns de simulación de producción). Se completó un análisis adicional utilizando un mapa de superficie hidrófoba dentro del soporte lógico Maestro de Schrodinger (v. 8.5.207). La superficie de la proteína analizada por estos dos métodos es bastante hidrófila. Incluso con ambas técnicas, no hubo residuos que contribuyeran a que estuvieran presentes parches hidrófobos sobre las superficies, por lo tanto, no se sugirió ninguna mutación anti-agregación.

3) Humanización por medio de injerto

La humanización utilizando técnicas de injerto ha sido previamente descrita (P.T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, G. Winter, Nature 1986, 321:522-525). La humanización se inició mediante la identificación de los dos líneas germinales humanas más próximas a las cadenas pesada y ligera del dominio variable de A44 anti-PAI-1. Esto se realizó llevando a cabo una búsqueda BLAST vs. todas las líneas germinales humanas que se enumeraron de forma sistemática (todas las posibles combinaciones de los dominios V y J para las cadenas kappa y lambda; dominios V, D y J para las cadenas pesadas). Las búsquedas BLAST se realizaron utilizando una aplicación de intranet vinculada a la información del Sequence Information Retrieval and Analysis (SIRA) proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La línea germinal humana más cercana identificó 70% y 67% de identidad de secuencia con las cadenas ligera y pesada del dominio variable de A44 anti-PAI1, respectivamente. Mediante el uso de las secuencias internas de la línea germinal VBASE, la cadena ligera se encontró que la cadena ligera estaba próxima al locus V I-018 (aproximadamente 64% de identidad) y la cadena pesada estaba próxima al locus 4-30 (aproximadamente 69% de identidad) de la subfamilia VH4. Las regiones CDR (basadas en Kabat) y los residuos de Vernier se indican en cursiva para la cadena ligera de mA44 (A44LC) y para IGVK1-33-01_JGKJ4-01 (IGVK1). Los residuos de Vernier definidos en J. Mol. Biol, 1992, 224, 487 están subrayados. Las mutaciones humanizantes (en negrita) se obtuvieron mediante la realización de una comparación por pares de las dos secuencias alineadas, con exclusión de los residuos de la CDR y de la zona de Vernier (también subrayado en la murina) como se definió anteriormente. Se mutaron T46L y Q69T de la cadena ligera murina y M2V de la cadena pesada murina (residuo de la zona Vernier) a la secuencia de la línea germinal humana conservada predominantemente como una parte de la humanización mediante el enfoque del injerto (LC5a, HC5A). En otra variante, estos tres residuos de la zona de Vernier se conservaron como se ve en la secuencia murina

original (LC5b, HC5b).

mA44 – Cadena ligera (SEQ ID NO: 141)

D*I*K*M*TQSPSS MYASLGERVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

*ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSLEY EDMGIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

GTKLEIK

IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (SEQ ID NO: 107)

DI**Q**MTQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK**A**PKLLIYD

ASNLETGVPS RFSGSGSGTD F**TF**TISSL**QP** ED**IAT**YYCQQ YDNLPLTFGG

GTK**V**EIK

*m*A44 – Cadena pesada (SEQ ID NO: 140)

E*M*QLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT*GDSMT NGYWN*WIRKF

PGNKLE*YMGY ITYSGSTY*YN PSLKGR*IS*I*T R*N*TSKNQ*Y*YL

QLSSVTTEDT ATYYC*ARWHY GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 (SEQ ID NO: 108)

QVQLQESGP**G** LVKPS**E**TLSL TC**T**V**S**GGSVS SYYWSWIR**QP**

PG**KG**LEWIGY IYYSGSTNYN PSLK**S**RV**TIS** V**D**TSKNQF**S**L

KLSSVT**AA**DT A**V**YYCARGYS SSWYYFDYWG QGT**LV**TVSS

La línea germinal humana más cercana fue identificada con 59% y 58% de identidad de secuencia con las cadenas ligera y pesada del dominio variable de A44 anti-PAI1, respectivamente. Utilizando la línea germinal VBASE interna, se encontró que esta cadena ligera estaba cerca del locus VkIII-L6 (identidad ~56%) y la cadena pesada cerca del locus 6-01 locus de la subfamilia VH6. Las regiones CDR (basadas en Kabat) y las regiones de Vernier se indican en cursiva. Las regiones de Vernier (como se definen en *J. Mol. Biol.*, **1992**, 224, 487) subrayadas. Las mutaciones humanizantes se obtuvieron mediante la realización de una comparación por pares de las 2 secuencias alineadas, con exclusión de los residuos de CDR y de la zona de Vernier (también subrayados en la murina) como se definió anteriormente y se muestran en negrita.

mA44 – Cadena ligera (SEQ ID NO: 141)

D*I*K*M*TQSPSS MYASLGERVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

*ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSLEY EDMGIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

GTKLEIK

IGKV3-11-02_IGKJ4-01 (SEQ ID NO: 143)

EI**V**LTQSP**AT LSL**S**P**GER**A**T **LS**CRASQSVS SYLAWYQQKP G**QA**P**R**LLIYD

ASNRATG**IP**A RFSGSGSGRD F**T**LTISSLE**P** ED**FAV**YYCQQ RSNWPLTFGG

GTK**V**EIK

mA44 – Cadena pesada (SEQ ID NO: 140)
E*M*QLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT*GDSMT N..GYWN*WIR
KFPGNKLE*YM GYIT..YSGS TYY*NPSLKGR *ISITRNTSKN*
Q*Y*YLQLSSVT TEDTATYYC*A RWHYGSPYYF DYW*GQGTTLT VSS
IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 (SEQ ID NO: 144)
QVQLQ**Q**SGP**G** LVKPSQTLSL TC**AIS**GDSVS SNSAAWNWIR
QSP**SRG**LEWL GRTYYRSKWY NDY**AV**S**V**K**S**R I**TIN**P**D**TSKN
QF**S**LQL**N**SVT **P**EDTA**V**YYCA RGYSSSWYYF DYWGQGT**LV**T VSS

4) Mutación de motivos de secuencias no deseados

Se consideraron los siguientes motivos de secuencias: Asp-Pro (enlace lábil a los ácidos), Asn-X Ser/Thr (glicosilación, X = cualquier amino-ácido, excepto Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (formación de succinimida/iso-asp en las regiones flexibles), Asn-Gly/Su/Ser/Aia/Cys (sitios de desamidación expuestos), y Met (oxidación en áreas expuestas). Los dominios VL y VH de A44 anti-PaI-1 murino poseen dos posibles sitios de glicosilación: $N^{52}RS$ (en CDR2) en la LC y $N^{72}TS$ en la HC. Un sitio desamidación expuesto está presente en la CDR1 del HC ($N^{31}G$). Se identificaron tres sitios potenciales de formación de succinimida en la secuencia murina original: $D^{56}G$ (final de CDR2) en LC, y $D^{27}S$ (en CDR1) y $D^{89}T$ en la HC. Los motivos problemáticos de LC, $N^{52}RS$ y $D^{56}G$, están ambos en la CDR2. Dado que estas mutaciones se producían en una CDR, fueron abordadas mediante la mutación en dos secuencias modificadas genéticamente propuestas más abajo (LC2 y LC4). N^{52} fue mutado conservativamente a Gln y D^{56} fue mutado a Glu. Existen cuatro residuos problemáticos en la HC Los dos primeros se producen en la CDR1: el sitio de formación de succinimida potencial, $D^{27}S$, y el sitio de desamidación $N^{31}G$. También pueden aparecer dos motivos problemáticos adicionales en la tercera región marco. En la CDR1, D^{27} se mutó a E para evitar la formación de succinimida, mientras que N^{31} fue alterado a Q. N^{72} y D^{89} fueron alterados a Q y E, respectivamente. Estos motivos problemáticos se abordaron en secuencias modificadas genéticamente HC2a y HC4 descritas a continuación. La variante HC2b sólo contiene la mutación del sitio de desamidación $N^{31}G$.

Las secuencias humanizadas resultantes se sometieron a análisis BLAST para determinar la similitud de secuencia frente a la base de datos de IEDB (que se encuentra en la Red en immuneepitope.com, versión de Junio de 2009; Vita R., Zarebeski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. La base de datos de epítopos inmunitarios 2.0 Nucleic Acids Res. 2010, Enero, 38 (Database issue):D854-62 Epub 2009, Noviembre 3) para asegurar que ninguna de las secuencias

contiene ningún epítopo de células B o T conocido (identidad de secuencia del 70%, utilizado como corte para los resultados obtenidos a través de la búsqueda BLAST y teniendo en cuenta sólo los resultados de la especie humana). DeClerck, et. al., (Publicación Internacional Núm. WO 2002034776) han dado a conocer epítopos de PAI-1 de unión a anticuerpos, ninguno de los cuales son problemáticos para los epítopos descritos en la presente memoria.

Para la LC de A44 murino, hay un epítopo humano de Kirschmann et al. (The Journal of Immunology, 1995, 155, 5655-5662). Éste posee una identidad de ~71% en un tramo de 14 aminoácidos como se observa a continuación. La secuencia sujeto era una secuencia parcial que no había sido verificada por medio de espectrometría de masas. No hay datos de unión para este péptido. Este epítopo se observó en todas variantes de LC propuestas. No se identificaron epítopos potencialmente problemáticos cuando se realizó una búsqueda similar para la HC.

5) Secuencias originales de los dominios variables anti-PAI1

Las CDR se resaltan en negrita y las regiones de Vernier (como definen Foote y Winter, J. Mol. Biol, 1992, 224: 487-499) están subrayadas.

Cadena ligera (SEQ ID NO: 142)

1 DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITC**KASQDIN SYLS**WLQQKP GKSPKTLIY**R**

51 **ANRSVD**GVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYC**LQ YDEFPPT**FGG

101 GTKLEIKRAD AAPTVSIF

Índice de germinalidad = 70% con IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-O18]

Cadena pesada (SEQ ID NO: 140)

1 EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT**G**DSMT **NGYWN**WIRKF PGNKLEYMG**Y**

51 **ITYSGSTY**YN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL QLSSVTTEDT ATYYCAR**WHY**

101 **GSPYYFDY**WG QGTTLTVSS

Índice de germinalidad = 67% con IGHV4-59-02_IGHD6-137-01_IGHJ4-02 [VH4 4-30]

6) Secuencias modificadas genéticamente

Se aplicaron enfoques de humanización 4D e injerto a las dos secuencias de la línea germinal humana más próximas

a) Secuencias de cadena ligera modificadas genéticamente

LC1a contiene siete mutaciones derivadas del método de humanización 4D utilizando la secuencia de la línea germinal más próxima, vk1. LC1b tiene 12 mutaciones

derivadas de la humanización 4D para la segunda secuencia de la línea germinal humana más próxima, VI3. LC2 contiene 2 mutaciones adicionales en CDR2 en comparación con LC1a. Estas mutaciones abordan un sitio potencial de glicosilación ($N^{52}RS$) y un sitio potencial de formación de succinimida ($D^{56}G$). LC3 contiene las mutaciones de la humanización 4D para la secuencia de la línea germinal más próxima con 2 mutaciones estabilizantes adicionales. LC4 combina las mutaciones humanizantes, estabilizadores y los motivos no deseados. Las CDR y las zonas de Vernier están en cursiva, los residuos de Vernier están subrayados, las mutaciones humanizantes están en negrita, los motivos problemáticos están en doble tachado y las mutaciones estabilizantes se muestran en minúsculas. Las Figuras 16 y 17 muestran los resúmenes de las mutaciones.

LC1a (SEQ ID NO: 91):

1 D*I*K*M*TQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** ED**L**GIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKLEIK

No se encuentran epítopos humanos adicionales para la secuencia LC1a en la base de datos IEDB. Índice de germinalidad LC1a = 76% con IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC1b (SEQ ID NO: 92):

1 D*I*K*M*TQSPSS **VSV**S**P**G**QT**VT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP G**Q**SPK*TLIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QA M**D**E**GIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKL**T**IK

Además del epítopo descrito en la sección 4 anterior, K39PGQSPKTLI tiene una identidad de secuencia de 70% con KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655 a 5662). Se informa de que este péptido tiene una CI50 > 100.000 nM contra todos los alelos HLA-DR para los cuales fue sometido a ensayo. Índice de germinalidad de LC1b = 67% con IGKV1-33-01 JGKJ4-01 [VkI-O18].

LC2 (SEQ ID NO: 93):

1 D*I*K*M*TQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

51 *A~~Q~~RSV~~E~~*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** ED**L**GIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKLEIK

No se encontraron epítopos humanos adicionales para la secuencia LC2 en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad LC2 = 76% con IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC3 (SEQ ID NO: 94):

1 D*I*K*M*TQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** ED**L**atYYC*LQ YDEFPPTF*GG
101 GTKLEIK

No se encontraron epítopos humanos adicionales para la secuencia LC3 en la base de datos IEDB. Índice de germinalidad LC3 = 78% con IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC4 (SEQ ID NO: 95):
1 D*I*K*M*TQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*
51 *A~~Q~~RSV~~E~~*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** ED**L**atYYC*LQ YDEFPPTF*GG
101 GTKLEIK

No se encontraron epítopos humanos adicionales para la secuencia LC4 en la base de datos IEDB. Índice de germinalidad LC4 = 78% con IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC5a (SEQ ID NO: 96):
1 D*I***Q***M*TQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GK**A**PK**L***LIYR*
51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*G***T***D *Y***TF**TISSL**QP** ED**IAT**YYC*LQ YDEFPPTF*GG
101 GTK**V**EIK

Además del epítopo descrito en la sección 4 anterior, A43PKLLIYRAN tiene una identidad de secuencia de 80% con APKLLIYAASSL (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). El peso molecular no se determinó en este péptido y no se informó sobre los datos de unión. Índice de germinalidad LC5a = 85% con IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC5b (SEQ ID NO: 97):
1 D*I***Q***M*TQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GK**A**PK*TLIYR*
51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y***TF**TISSL**QP** ED**IAT**YYC*LQ YDEFPPTF*GG
101 GTK**V**EIK

No se identificaron epítopos humanos adicionales para la secuencia LC5b en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad LC5b = 83% con IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC5c (SEQ ID NO: 98):
1 **E***I***V***M*TQSP**AT LSL**S**P**GER**A**T **LS**C*KASQDIN SYLSWL*QQKP G**QA**P**R***TLIYR*
51 *ANRSVD*G**I**P**A** RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y***T**LTISSLE**P** ED**FAV**YYC*LQ YDEFPPTF*GG
101 GTK**V**EIK

Además del epítopo descrito en la sección 4 anterior, K^{39}PGQAPRTLI tiene una identidad de secuencia de 80% con KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Se informa de que este péptido tiene una CI50 > 100.000 nM frente a todos los alelos HLA-DR para los cuales fue sometido a ensayo. Índice de germinalidad LC5a = 79% con IGKV3-11-02_IGKJ4-01 [VKIII-L6]. Se muestra en la Figura 15 un esquema de

todas las mutaciones de la cadena ligera.

b) Secuencias de la cadena pesada modificadas genéticamente

HC1a contiene ocho mutaciones derivadas del método de inmunización 4D para la secuencia de la línea germinal humana más próxima. HC1b contiene seis mutaciones derivadas del método de humanización 4D para la 2ª secuencia de la línea germinal más próxima. HC2a contiene cuatro mutaciones adicionales cuando se compara con HC1a para dirigirse a motivos de secuencia no deseados. HC2b solamente aborda el sitio de desamidación de CDR1 ($N^{31}G$). HC3 contiene las mutaciones humanizantes de HC1a con cinco mutaciones estabilizantes adicionales. HC4 contiene mutaciones humanizantes de HC1a, mutaciones estabilizantes de HC3 y mutaciones que se dirigen a motivos problemáticos de HC2a. Las CDR y las zonas de Vernier están en cursiva, los residuos de Vernier están subrayados, las mutaciones humanizantes están en negrita, los motivos problemáticos están doblemente tachados y las mutaciones estabilizantes se muestran en minúscula.

HC1a (SEQ ID NO: 82):

1 E*M*T**L**KESGP**T** LVKP**T**QTLSL TCSVT*GDSMT NGYWN*WIRKF PG**KA**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLKGR*ISI*T *R*N*T*SKNQ*Y*YL **T**LSSVTT**V**DT ATYYC*AR**WHY***

101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC1a en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC1a = 68% con IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC1b (SEQ ID NO: 83):

1 E*M*QLQESGP**G** LVKPS**E**TLSL TCSVT*GDSMT NGYWN*WIRKF PG**KG**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLKGR*ISI*T *R*N*T*SKNQ*Y*YL **K**LSSVTT**A**DT ATYYC*AR**WHY***

101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC1b en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC1b = 73% con IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC2a (SEQ ID NO: 84):

1 E*M*T**L**KESGP**T** LVKP**T**QTLSL TCSVT*G~~E~~SMT ~~Q~~GYWN*WIRKF PG**KA**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLKGR*ISI*T *R~~Q~~T*SKNQ*Y*YL **T**LSSVTTV~~E~~T ATYYC*AR**WHY***

101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC2a en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC2a = 67% con IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC2b (SEQ ID NO: 85):

1 E*M*T**L**KESGP**T** LVKP**T**QTLSL TCSVT*GDSMT ~~Q~~GYWN*WIRKF PG**KA**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLKGR*I*S*I*T *R*N*T*SKNQ*Y*YL **T**LSSVTT**V**DT ATYYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC2b en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC2b = 67% con IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC3 (SEQ ID NO: 86):

1 q*M***T**L**K**ESGP**T** LVKP**T**QTLSL TCSVs*GDSMT NGYWN*WIRqF PG**KA**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLKGR*I*t*I*T *R*d*T*SKNQ*Y*YL **T**LSSVTT**V**DT ATYYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC3 en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC3 = 72% con IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC4 (SEQ ID NO: 87):

1 q*M***T**L**K**ESGP**T** LVKP**T**QTLSL TCSVs*G~~E~~SMT ~~Q~~GYWN*WIRqF PG**KA**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLKGR*I*t*I*T *R~~Q~~T*SKNQ*Y*YL **T**LSSVTT**V~~E~~**T ATYYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC4 en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC4 = 70% con IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC5a (SEQ ID NO: 88):

1 **Q***V*QLQESGP**G** LVKPS**E**TLSL TC**T**V**S***GDSMT NGYWN*WIR**QP** PG**KG**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLK**S**R*I***T***I***S** *R*N*T*SKNQ*Y***S**L **K**LSSVT**AA**DT A**V**YYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYW*G QGT**LV**TVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC5a en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC5a = 84% con IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5b (SEQ ID NO: 89):

1 **Q***M*QLQESGP**G** LVKPS**E**TLSL TC**T**V**S***GDSMT NGYWN*WIR**QP** PG**KG**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY*N PSLK**S**R*I***T***I***S** *R***D***T*SKNQ*Y***S**L **K**LSSVT**AA**DT A**V**YYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYW*G QGT**LV**TVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC5b en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC5b = 84% con IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5c (SEQ ID NO: 90):

1 **Q***M*QLQ**Q**SGP**G** LVKPSQTLSL TC**AIS***GDSMT NGYWN*WIR**QS** P**SRG**LE*YMGY*

51 *ITYSGSTYY***A V**S**V**K**S**R*I***T***I***N** *R***D***T*SKNQ*Y***S**L QLSSVT**P**EDT A**V**YYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYW*G QGT**LV**TVSS

No se identificaron epítopos humanos para la secuencia HC5c en la base de datos IEDB.

Índice de germinalidad HC5c = 78% con IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH6 6-01]. En la Figura 16 se muestra un esquema de todas las mutaciones de la cadena pesada.

c) Combinaciones de secuencias variantes de la cadena pesada y ligera

Para el injerto, se crearon tres versiones de la cadena ligera (LC5a, LC5b, LC5c) y tres versiones de la cadena pesada (HC5a, HC5b, HC5c). LC5a contiene 16 mutaciones derivadas del injerto más cercano en la secuencia de la línea germinal humana y la conservación de la CDR murina y la mayoría de los residuos de la zona de Vernier murina. Dos residuos de Vernier murinos, T46 y N69 no están presentes en ninguna secuencia de la línea germinal humana y se mutaron de forma conservativa. LC5b contiene 14 mutaciones derivadas del injerto más cercano en la secuencia de la línea germinal humana y conservaba la CDR murina y todos los residuos de la zona de Vernier murina. LC5c contiene 22 mutaciones derivadas del injerto en la secuencia de la línea germinal humana más cercana segundos y retuvo el CDR murinos y todos los residuos de la zona Vernier murinos.

HC5a contiene 20 mutaciones derivadas del injerto más cercano en la secuencia de la línea germinal humana y conservaba la CDR murina y la mayoría de los residuos de la zona de Vernier murina con la excepción de M2V. Met aparece con una propensión muy baja en esta posición en las secuencias de la línea germinal humana. HC5b contiene 20 mutaciones derivadas del injerto en la secuencia de la línea germinal humana más cercana y conservaba la CDR murina y todos los residuos de la zona de Vernier murina. HC5c contiene 23 mutaciones derivadas del injerto en la segunda secuencia de la línea germinal humana más cercana y conservaba la CDR murina y todos los residuos de la zona de Vernier murina. Se prepararon en total diez combinaciones (resumidas en la Tabla 19):

- LC1a x HC1a (mutaciones que dirigen la humanización 4D basada en la secuencia de la línea germinal más cercana
- LC1b x HC1b (mutaciones que dirigen la humanización 4D basada en la 2ª secuencia de línea germinal más cercana)
- LC2 x HC2a (mutaciones que dirigen la humanización 4D y secuencias no deseadas)
- LC2 x HC2b (mutaciones que dirigen la humanización 4D y secuencias no deseadas)
- LC1a x HC2b (mutaciones que dirigen la humanización 4D y secuencias no deseadas)
- LC3 x HC3 (mutaciones que dirigen la humanización 4D y la estabilización)
- LC4 x HC4 (mutaciones que dirigen la humanización 4D, secuencias no deseadas y la estabilización)

• LC5a x HC5a (mutaciones que dirigen la humanización por injerto de las CDR conservadas e incorporan 3 modificaciones de Vernier conservativas)

• LC5b x HC5b (mutaciones que dirigen la humanización por injerto de las CDR conservadas y regiones de Vernier)

• LC5c x HC5c (mutaciones que dirigen la humanización por injerto de las CDR conservadas y regiones de Vernier)

Tabla 19: Resumen de las diez combinaciones LC x HC

	LC1a (H)	**LC1b (H)**	**LC2 (H+UM)**	**LC3 (H+S)**	**LC4 (H+UM+S)**	**LC5a (G)**	**LC5b (G)**	**LC5c (G)**
HC1a (H)	X(1)							
HC1b (H)		X(2)						
HC2a (H+UM)			X(3) Bajo					
HC2b (H+UM)	X(4)		X(5)					
HC3 (H+S)			X(11)	X(6)	X (12)			
HC4 (H+UM+S)					X(7) Low			
HC5a (G)						X(8)		
HC5b (G)			X(13)		X(14)		X(9)	
HC5c (G)								X(10) Bajo

H=humanización; UM= motivos no deseados; S=estabilizante; G=injerto

Bajo=niveles de expresión bajos

El número dentro de () indica el número de la variante; nota: las variantes 11 – 14 se añadieron después de la caracterización de las diez variantes originales (variantes 1-10)

Tabla 21: Mutaciones de las ocho variantes de LC del anticuerpo anti-PAI1 A44

Numeración sucesiva LC	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H-UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H-UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
Asp1								Glu
Lys3						Gln	Gln	Val
Ser9								Ala
Ser10								Thr
Met11	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
Tyr12	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Ala13		Val						Leu
Leu15	Val	Pro	Val	Val	Val	Val	Val	Pro
Glu17	Asp	Gln	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	
Arg18		Thr						
Val19								Ala
Ile21								Leu
Thr22								Ser
Lys42		Gln						Gln
Ser43						Ala	Ala	Ala
Lys45								Arg
Thr46						Leu		
Asn52			Gln		Gln			
Asp56			Glu		Glu			
Val58								Ile
Ser60								Ala
Gln69						Thr		
Ser72						Thr	Thr	Thr
Leu73						Phe	Phe	
Glu79	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	
Tyr80	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro

Glu81		Met						
Met83	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe
Gly84				Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Ile85				Thr	Thr	Thr	Thr	Val
Leu104						Val	Val	Val
Glu105		Thr						
Número de mutaciones	7	12	9	9	11	16	14	22
H=humanización; UM= motivos no deseados; S=estabilizante; G=injerto								

Tabla 22: Mutaciones de las nueve variantes HC del anticuerpo anti-PAI1 A44

Numeración sucesiva HC	HC1a (H)	HC1b (H)	HC2a (H-UM)	HC2b (H-UM)	HC3 (H+S)	HC4 (H-UM+S)	HC5a (G)	HC5b (G)	HC5c (G)
Glu1					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Met2							Val		
Gln3	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Glu5	Lys		Lys	Lys	Lys	Lys			Gln
Ser10	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly
Ser15	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Gln16		Glu					Glu	Glu	
Ser23							Thr	Thr	Ala
Val24									Ile
Thr25					Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Asp27			Glu			Glu			
Asn31			Gln	Gln		Gln			
Lys39					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Phe40							Pro	Pro	Ser
Gly42									Ser
Asn43	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg
Lys44	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly
Asn60									Ala
Pro61									Val
Leu63									Val
Gly65							Ser	Ser	Ser
Ser68					Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
Thr70							Ser	Ser	Asn
Asn72			Gln		Asp	Gln		Asp	Asp
Tyr79							Ser	Ser	Ser
Gln81	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Lys	
Thr87							Ala	Ala	Pro
Glu88	Val	Ala	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	
Asp89			Glu			Glu			

Thr92							Val	Val	Val
Thr114							Leu	Leu	Leu
Leu115							Val	Val	Val
Número de mutaciones	8	6	12	9	13	16	20	20	23
H=humanización; UM= motivos no deseados; S=estabilizante; G=injerto									

En resumen, se generaron diez variantes durante el procedimiento de humanización. Estas variantes se expresaron y se caracterizaron en varios análisis *in vitro* como se describe más abajo.

7) Caracterización de variantes de humanización

Basándose en el modelado in silico presentado en el ejemplo anterior, se generaron diez variantes (variantes 1 - 8 por humanización 4D y variantes 9 - 10 por injerto de CDR; las variantes 3 y 10 fueron creados en la segunda línea germinal más cercana). Se prepararon la región variable de la cadena ligera y el ADN de la cadena pesada de A44 humanizado para la expresión en HEK293. Se generaron las proteínas después de la clonación del ADN correspondiente en plásmidos pXL (New England Biolabs; NHEt/Eco47IIT para la HC, NheI/BsiWI para la LC). Las secuencias humanizadas fueron de codón optimizado para la expresión en HEK y el gen sintetizado por GeneArt (subsidiaria de Life Technologies). Los plásmidos resultantes fueron co-transfectadas transitoriamente y expresados en FreeStyle™ 293 Expression System (Invitrogen, Núm. de Cat. K9000-0 i). Las variantes 3 y 10 fueron muy escasamente expresadas y no se utilizaron más. Todas las demás variantes se expresaron y purificaron utilizando columnas de Proteína A. Los geles analíticos mostraron una glicosilación parcial (aproximadamente 5 - 10%) de las cadenas ligeras en las variantes 6 y 9 y de las cadenas pesadas en las variantes 5 y 7 (datos no presentados). Las ocho variantes restantes fueron sometidas a análisis cromogénico utilizando hPAI y análisis de generación de plasmina en las células estrelladas humanas utilizando PAI glicosilado humano. Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23: Caracterización de variantes de humanización en el análisis de generación de plasmina y cromogénico

	Activación de plasminógeno		Análisis cromogénico
mAb	**CI50 (nM)**	**Y50%**	**CI50 (nM)**
A44	3,17	45,99	0,44
A44-hv1	3,12	44,99	0,49
A44-hv2	No determinado	No determinado	0,60
A44-hv4	Inactivo	26,00	0,52
A44-hv5	No determinado	No determinado	1,11
A44-hv6	1,78	56,94	0,82
A44-hv7	No determinado	No determinado	0,59
A44-hv8	Inactivo	11,00	0,76
A44-hv9	1,9	46,53	0,86

Las variantes 6 y 9 mostraron la mejor potencia en el análisis de generación de plasmina, pero tuvieron una glicosilación parcial (5-10%) en la cadena ligera. Basándose en estos resultados, las nuevas variantes! 11-14 fueron producidas utilizando combinaciones de cadenas pesadas de las variantes 6 y 9 y cadenas ligeras de las variantes 5 y 7. La Tabla 24 resume todas las variantes creadas.

Tabla 24: variantes de humanización

Núm. Variante	Descripción	SEQ ID NO
A44-hv1	LC1a x HC1a	109
A44-hv2	LC1b x HC1b	110
A44-hv3	LC2 x HC2a	111
A44-hv4	LC1a x HC2b	112
A44-hv5	LC2 x HC2b	113
A44-hv6	LC3 x HC3	114
A44-hv7	LC4 x HC4	115
A44-hv8	LC5a x HC5a	116
A44-hv9	LC5b x HC5b	117
A44-hv10	LC5c x HC5c	118
A44-hv11	LC2 x HC3	119

A44-hv12	LC4 X HC3	120
A44-hv13	LC2 x HC5b	121
A44-hv14	LC4 x HC5b	122

Tabla 25: Variantes de humanización de la secuencia de ADN

	Gen	**Proteína**
HC1a	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTG GTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGC AGCGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTAC TGGAACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCC CTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGC AGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGG ATCAGCATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAG TACTACCTGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 123)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVTGDSMTNGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL TLSSVTTVDTATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 82)
HC1b	GAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT GGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTG CAGCGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTA CTGGAACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGG CCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGG CAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCG GATCAGCATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCA GTACTACCTGAAGCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 124)	EMQLQESGPGLVKPSETLS LTCSVTGDSMTNGYWNWIR KFPGKGLEYMGYITYSGSTY YNPSLKGRISITRNTSKNQY YLKLSSVTTADTATYYCARW HYGSPYYFDYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO: 83)
HC2a	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTG GTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGC AGCGTGACCGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTA CTGGAACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGC CCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGG CAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCG GATCAGCATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCA GTACTACCTGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 125)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVTGESMTQGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRQTSKNQYY LTLSSVTTVETATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 84)
HC2	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTG	EMTLKESGPTLVKPTQTLSL

b	GTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGC AGCGTGACCGGCGACAGCATGACCCAGGGCTA CTGGAACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGC CCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGG CAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCG GATCAGCATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCA GTACTACCTGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 126)	TCSVTGDSMTQGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL TLSSVTTVDTATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 85)
HC3	CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTG GTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGC AGCGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTAC TGGAACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGCC CTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGC AGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGG ATCACCATCACCCGGGACACCAGCAAGAACCAG TACTACCTGACCCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 127)	QMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVSGDSMTNGYWNWIR QFPGKALEYMGYITYSGSTY YNPSLKGRITITRDTSKNQY YLTLSSVTTVDTATYYCARW HYGSPYYFDYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO: 86)
HC4	CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTG GTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGC AGCGTGTCCGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTA CTGGAACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGC CCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGG CAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCG GATCACCATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCA GTACTACCTGACCCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 128)	QMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVSGESMTQGYWNWIR QFPGKALEYMGYITYSGSTY YNPSLKGRITITRQTSKNQY YLTLSSVTTVETATYYCARW HYGSPYYFDYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO: 87)
HC5a	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT GGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTG CACCGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTA CTGGAACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGG GCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCG GCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCC GGATCACCATCAGCCGGAACACCAGCAAGAACC AGTACAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTG	QVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGDSMTNGYWNWIR QPPGKGLEYMGYITYSGST YYNPSLKSRITISRNTSKNQY SLKLSSVTAADTAVYYCAR WHYGSPYYFDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 88)

	(SEQ ID NO: 129)	
HC5b	CAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT GGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTG CACCGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTA CTGGAACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGG GCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCG GCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCC GGATCACCATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACC AGTACAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 130)	QMQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGDSMTNGYWNWIR QPPGKGLEYMGYITYSGST YYNPSLKSRITISRDTSKNQY SLKLSSVTAADTAVYYCAR WHYGSPYYFDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 89)
HC5c	CAGATGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCCT GGTCAAACCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTG CGCCATCAGCGGCGACAGCATGACCAACGGCTA CTGGAACTGGATCCGGCAGAGCCCCAGCAGAG GCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCG GCAGCACCTACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCC GGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACC AGTACAGCCTGCAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 131)	QMQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCAISGDSMTNGYWNWIR QSPSRGLEYMGYITYSGSTY YAVSVKSRITINRDTSKNQY SLQLSSVTPEDTAVYYCAR WHYGSPYYFDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 90)
LC1a	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC ATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCT GAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCC CCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCG TGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCG GCAGCGGCCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCA GCCTGCAGCCCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO: 132)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDINSYLSWLQQKP GKSPKTLIYRANRSVDGVPS RFSGSGSGQDYSLTISSLQP EDLGIYYCLQYDEFPPTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 91)
LC1b	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCGTG TCCGTGTCTCCTGGCCAGACCGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTG AGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCC CAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGT GGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCG	DIKMTQSPSSVSVSPGQTVT ITCKASQDINSYLSWLQQKP GQSPKTLIYRANRSVDGVPS RFSGSGSGQDYSLTISSLQA MDEGIYYCLQYDEFPPTFG GGTKLTIK

	GCAGCGGCCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCA GCCTGCAGGCCATGGACGAGGGCATC (SEQ ID NO: 133)	(SEQ ID NO: 92)
LC2	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC ATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCT GAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCC CCAAGACCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGC GTGGAAGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAG CGGCTCCGGCCAGGACTACAGCCTGACCATCAG CAGCCTGCAGCCCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO: 134)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDINSYLSWLQQKP GKSPKTLIYRAQRSVEGVPS RFSGSGSGQDYSLTISSLQP EDLGIYYCLQYDEFPPTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 93)
LC3	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC ATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCT GAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCC CCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCG TGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCG GCAGCGGCCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCA GCCTGCAGCCCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO: 135)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDINSYLSWLQQKP GKSPKTLIYRANRSVDGVPS RFSGSGSGQDYSLTISSLQP EDLATYYCLQYDEFPPTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 94)
LC4	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC ATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCT GAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCC CCAAGACCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGC GTGGAAGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAG CGGCTCCGGCCAGGACTACAGCCTGACCATCAG CAGCCTGCAGCCCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO: 136)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDINSYLSWLQQKP GKSPKTLIYRAQRSVEGVPS RFSGSGSGQDYSLTISSLQP EDLATYYCLQYDEFPPTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 95)
LC5a	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC ATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCT GAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDINSYLSWLQQKP GKAPKLLIYRANRSVDGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP

	CCAAGCTGCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCG TGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCG GCTCCGGCACCGACTACACCTTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO: 137)	EDIATYYCLQYDEFPPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 96)
LC5b	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC ATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCT GAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCC CCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCG TGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCG GCAGCGGCCAGGACTACACCTTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO: 138)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCKASQDINSYLSWLQQKP GKAPKTLIYRANRSVDGVPS RFSGSGSGQDYTFTISSLQP EDIATYYCLQYDEFPPTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 97)
LC5c	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTG TCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGC TGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTG AGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCC CAGAACCCTGATCTACCGGGCCAACAGAAGCGT GGACGGCATCCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCG GCTCCGGCCAGGACTACACCCTGACCATCAGCA GCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTG (SEQ ID NO: 139)	EIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCKASQDINSYLSWLQQKP GQAPRTLIYRANRSVDGIPA RFSGSGSGQDYTLTISSLEP EDFAVYYCLQYDEFPPTFG GGTKVEIK (SEQ ID NO: 98)
	Proteína	
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF (SEQ ID NO: 99)	
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 100)	

Todas las variantes, a excepción de las variantes expresadas 3 y 10 escasamente

expresadas, se sometieron a ensayo en Biacore frente a PAI-1 humana y cyno y complejo de Vitronectina-PAI-1. Los datos se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26: Caracterización de variantes de humanización en un Biacore

Chip Vitronectina / PAI-1 Humana			
mAb/hPAI-1/Vn	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**
A44 parental *	5,68E+06	2,29E-04	4,04E-11
A44-hv1*	1,10E+07	5,55E-04	5,26E-11
A44-hv2**	2,99E+06	4,03E-04	1,35E-10
A44-hv4*	4,59E+06	8,80E-05	1,92E-11
A44-hv5*	2,72E+06	2,76E-05	1,02E-11
A44-hv6*	4,38E+06	5,68E-05	1,33E-11
A44-hv7**	4,14E+06	3,94E-04	9,64E-11
A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6,36E+06	1,03E-04	1,70E-11
A44-hv11*	7,66E+06	1,22E-04	1,56E-11
A44-hv12*	5,15E+06	8,14E-05	1,61E-11
A44-hv13**	2,40E+06	4,36E-04	1,79E-10
A44-hv14*	4,06E+06	3,95E-05	9,57E-12
Chip Vitronectina / PAI-1 Cyno			
mAb/cPAI-1/Vn	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**
A44 parental *	3,98E+06	2,75E-04	6,96E-11
A44-hv1**	3,37E+06	8,27E-03	2,45E-09
A44-hv2**	2,30E+06	3,14E-04	1,37E-10
A44-hv4**	2,26E+05	1,70E-04	7,52E-10
A44-hv5*	3,40E+06	1,11E-04	3,26E-11
A44-hv6*	5,26E+06	2,51E-05	5,01E-12
A44-hv7**	2,50E+06	2,39E-04	9,56E-11
A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6,51E+06	1,34E-04	2,15E-11
A44-hv11**	1,56E+06	6,00E-04	3,87E-10
A44-hv12*	4,26E+06	2,35E-04	5,69E-11
A44-hv13**	2,12E+06	2,43E-04	1,15E-10
A44-hv14*	5,86E+06	2,13E-04	3,86E-11

Chip Anti-Fc de IgG humana / PAI-1 humana			
mAb/hPAI-1*	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**
A44-hv11/hPAI-1	1,57E+06	6,68E-05	4,25E-11
A44-hv12/hPAI-1	1,62E+06	6,70E-05	4,14E-11
A44-hv13/hPAI-1	1,54E+06	2,52E-05	1,64E-11
A44-hv14/hPAI-1	1,25E+06	3,42E-05	2,70E-11
Chip Anti-Fc de IgG humana / PAI-1 cyno			
mAb/cPAI-1*	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**
A44-hv11/hPAI-1	1,87E+06	5,60E-05	3,00E-11
A44-hv12/hPAI-1	2,24E+06	5,45E-05	2,44E-11
A44-hv13/hPAI-1	1,89E+06	5,08E-05	2,70E-11
A44-hv14/hPAI-1	2,32E+06	2,69E-05	1,15E-11
n/a significa que la variante no se unió eficazmente al complejo de vitronectina/PAI-1 *1:1 modelo de interacción molecular **Modelo de reacción en dos estados (cambio de conformación)			

Los datos de Biacore no revelaron diferencias significativas entre las variantes humanizadas. Todas las variantes humanizadas, excepto la variante 8, mostraron afinidad tanto para PAI-1 cyno como para PAI-1 humana y PAI-1 en complejo con vitronectina dentro de un intervalo aceptable. En comparación con A44 parental, la humanización no pareció cambiar la afinidad del anticuerpo.

Aunque la afinidad y la potencia de las variantes humanizadas no difirieron significativamente en los análisis cromogénicos y Biacore, la capacidad de las variantes para restaurar la generación de plasmina en los análisis celulares fue significativamente menor que la del anticuerpo parental de ratón para algunas variantes (véase la Tabla 27 que resume la comparación del análisis cromogénico y el análisis celular más abajo). Las variantes humanizadas 11 - 14 se sometieron a ensayo para determinar la capacidad de bloquear PAI-1 en el análisis celular.

Tabla 27: Caracterización de las variantes de humanización 11 a 14 en la generación de plasmina

	Activación de Plasminógeno		
mAb	**CI50 (nM)**	**Y50%**	**n**

A44	3,13	79,79	6
A44-hv11	2,01	85,82	6
A44-hv12	1,99	76,70	6
A44-hv13	1,82	71,10	6
A44-hv14	1,82	61,22	6
A44-hv9	1,51	50,92	4
A44-hv1	2,08	58,50	2

Las variantes 11 a 14 mostraron una buena potencia en el análisis de generación de plasmina y se caracterizaron adicionalmente en otros análisis in vitro.

8) Caracterización de variantes de humanización en el hígado humano

El escrutinio adicional de las variantes humanizadas 11-14 se realizó utilizando PAI-1 humano producido endógenamente a partir de plasma humano y muestras de hígado fibrótico humano.

La actividad de PAI-1 se evaluó midiendo la capacidad de este serpina para formar un complejo estable con uroquinasa inmovilizado sobre placas de 96 pocillos. Después de lavar la PAI-1 no unida, se detectaron complejos uPA-PAI-1 mediante la utilización de anticuerpos policlonales antiPAI-1. Los anticuerpos policlonales anti-PAI-1 unido (que es proporcional al PAI-1 activo en la muestra), se detectó a continuación mediante el uso de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Molecular Innovation Núm. Cat. HPAIKT). Varias concentraciones de variantes humanizadas de A44 se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, ya sea con PAI-1 recombinante humano o de cinomolgo (concentración final 0,31 nM) y después se sometió a ensayo para determinar el PAI-1 activo funcional por medio del complejo uPA-PAI-1 mediante el ELISA descrito anteriormente. Las muestras se compararon con un patrón de PAI-1 humano. El plasma humano de pacientes con un alto IMC con niveles elevados de PAI-1 activo se diluyó 4 veces y se incubó con cantidades crecientes de variantes humanizadas de A44. Los niveles de PAI-1 activo restantes se determinaron utilizando la detección con el complejo uPA-PAI-1 por medio de ELISA. También se sometió a ensayo la neutralización de PAI-1 recombinante cyno por medio de la generación de plasmina para confirmar la reactividad cruzada.

Tabla 28: Capacidad de las variantes humanizadas para bloquear la actividad de PAI-1 endógeno

Patrón de hPAI-1			TH1782 plasma h				PAI-1 de cyno		
CI50(nM)	**Y50%**	**n**	**mAb**	**CI50(nM)**	**Y50 %**	**N**	**CI50(nM)**	**Y50%**	**n**
1,31E-01	50,80	2	**A44-hv11**	1,57E-02	37,50	2	4,24E-02	50,80	2
1,14E-01	53,45	2	**A44-hv12**	3,35E-03	37,68	2	2,66E-02	53,45	2
1,66E-01	52,82	2	**A44-hv13**	3,11E-02	61,35	2	2,81E-02	52,82	2
5,63E-02	52,47	2	**A44- hv14**	5,86E-02	73,90	2	2,87E-02	52,47	2

Se homogeneizaron muestras de hígado fibrótico humano (proporcionadas por Biopredic International, Rennes, Francia de la resección quirúrgica de metástasis de colon hepático) como sigue: se homogeneizaron muestras de hígado congelado pesadas en tubos secos que contenían cuentas de cerámica (Núm. Cat 03961-1-003, Bertin Technology, Francia) utilizando un homogeneizador Precellys (Bertin Tecnhology, Francia; 4°C, 2 x 30 segundos a 6800 rpm) y después se disolvieron utilizando 1 ml/g de tampón de lisis (NaCl 1,5 M en solución de TBS - Tampón Tris Tris 0,1 M + NaCl 0,15 M pH 7,4). Después de la centrifugación a 4ºC a 5000g durante 10 minutos, se recogió el producto lisado de hígado en el sobrenadante y se almacenó congelado a -80ºC. La concentración de proteína total utilizando el análisis BSA convencional y los niveles de PAI-1 activo y total (determinados por medio de ELISA del complejo UK-PAI proporcionado por Mol Innov Núm. Cat. HPAIKT y Núm. Cat. MPAIKT-TOT) se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante trazando la concentración de PAI-1 humana patrón vs A450nm utilizando el soporte lógico Biostat Calibration. Se evaluaron concentraciones crecientes de variantes humanizadas de A44 incubadas con producto lisado de hígado diluidas a 2,5 nM de PAI-1 activo como se ha descrito anteriormente y se analizaron los datos. La inhibición de la actividad de PAI-1 (dejando la actividad de PAI-1 sin mAb una inhibición de 0%, no se produjo una inhibición significativa y dependiente de la dosis de PAI-1 con IgG1) se calculó para cada concentración de mAb. El porcentaje de inhibición de la actividad de PAI-1 se representó como una función de la concentración de mAb y se determinaron la CI50 e Imax utilizando el soporte lógico de velocidad Biostat. Los datos se muestran en la Figura 17 y en la Tabla 29.

Tabla 29: Neutralización de la actividad de PAI-l por A44-hv11 en hígado humano

	CI50 (nM)	**Imax (%)**
A44-hv11 (1 nM)	0,0365	99,997
A44-hv11 (2 nM)	0,0503	99,99

A44-hv11 (3 nM)	0,0465	99,99
Media +/- etm	0,0444 +/- 0,004	99,99

Basándose en los datos anteriores, se seleccionó A44-hv11 para una caracterización adicional en otros estudios estructurales adicionales y otros estudios in vitro e in vivo.

Ejemplo 13. Humanización del anticuerpo APG mediante injerto

La humanización utilizando técnicas de injerto ha sido previamente referida (P.T. Jones, et al., Nature 1986, 321: 522-525). La humanización del anticuerpo murino anti-PAI-1 APG comenzó con la cadena ligera murina (SEQ ID NO: 148) y la cadena pesada murina (SEQ ID NO: 149) de la Solicitud de Patente Alemana Núm. DE2000153251; este anticuerpo murino también es descrito por Debrock et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337(2): 257-266 (1997). La identificación de la línea germinal y las clases canónicas de la cadena HC y LC del anticuerpo murino produjo muIGHVI-39 y muIGKV14-111, respectivamente. A continuación se identificó la lista de líneas germinales humanas próximas a las cadenas ligera y pesada del dominio variable de APG anti-PAI-1 y se clasificó por el porcentaje de identidad. Ambas etapas se llevaron a cabo mediante la realización de una búsqueda BLAST vs. todas las líneas germinales humanas que se enumeraron de forma sistemática (todas las combinaciones posibles de los dominios V y J para las cadenas kappa y lambda; los dominios V, D y J para las cadenas pesadas). Las búsquedas BLAST se realizaron utilizando la herramienta IMGT/DomainGapAlign proporcionada en http://www.imgt.org. (Véase Ehrenmann, et al. Cold Spring Harbor Protocols 2011.6 (2011)). Las líneas germinales humanas más próximas se identificaron con una identidad de secuencia de 67,4% y 63,3% para las cadenas ligera y pesada del dominio variable de APG anti-PAI-1, respectivamente. Utilizando la base de datos IMGT, se descubrió que la cadena ligera estaba próxima a HuIGKV1-33 y la cadena pesada estaba próxima a HuTGHV1-46. Se encontró que la línea germinal humana más próxima a la cadena pesada del dominio variable de APG anti-PAI-1 con una clase canónica coincidente era HuIGHV7-4-l con una identidad de secuencia de 62,2%.

Las regiones CDR (basadas en una combinación de Kabat y IMGT para APG) y los residuos de Vernier se indican en cursiva para la cadena ligera de APG murino parental (mAPG) (SEQ ID NO: 148), IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (IGKV1a) (SEQ ID NO: 107) y para IGKV1-33-01_IGKJ2-02 (IGKV1b) (SEQ ID NO: 150) (véase la Tabla 30, a continuación). Los residuos de Vernier definidos por Foote, et al. *J. Mol. Biol.* 224 (2): 487-

99 (1992) están subrayados. Las mutaciones humanizantes (en negrita) se obtuvieron mediante la realización de una comparación por pares de las dos secuencias alineadas, con exclusión de los residuos de la CDR y la zona de Vernier (también subrayados en las secuencias de mAPG, Tabla 30) como se ha definido anteriormente. No se realizaron más modificaciones genéticas en el anticuerpo murino APG. Estos anticuerpos humanizados fueron denominados APGv2 y APGv4.

Tabla 30: Secuencias de humanización de APG

Cadena ligera APG	D*I*K*L*TQSPSS MYASLGERVT ITC*KASQDIY SYLSWF*QQKP GKSPK*TLIYR ANRLID*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSLEY EHMGIYYC*LQ YDEFPFT*FGS GTKLEIK (SEQ ID NO: 148)
Cadena pesada APG	Q*V*KLQESGPE LVKPGASVKI SCKAS*GYSFT DYNMN*WVKQS KGKSLE*WIGI IHPNSGTTTY NQKFKGKATL* T*V*D*Q*SSSTAY LQLNSLTSED SAVYYC*ARSK LRFFDY*WGQG TTVTVSS (SEQ ID NO: 149)
IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (IGKV1a)	DI**Q**MTQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK**A**PKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD F**TF**TISSL**QP** ED**IAT**YYCQQ YDNLPLTFGG GTK**V**EIK (SEQ ID NO: 107)
IGKV1-33-01_ IGKJ2-02 (IGKV1b)	DI**Q**MTQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK**A**PKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD F**TF**TISSL**QP** E**DIAT**YYCQQ YDNLPCSFG**Q** GTKLEIK (SEQ ID NO: 150)
IGHV7-4-1-02_ IGHJ4-03	QV**Q**L**VQ**SG**S**EL**K**KPGASVK**V**SCKASGYTFTSYAMNWV**R**Q**AP**G**QG**LE WMGWINTNTGNPTYAQGFTG**R**F**V**F**S**LDTS**V**STAYLQ**IS**SL**KA**ED**T**AV YYCARxxxxxYFDYWGQGT**L**VTVSS (SEQ ID NO: 151)
IGHV1-46-01_ IGHJ4-03	QV**Q**L**VQ**SG**A**E**VK**KPGASVK**V**SCKASGYTFTSYYMHWV**R**Q**AP**G**QG**L EWMGIINPSGGSTSYAQKFQG**R**VTMTRDTS**T**STVY**ME**L**S**SL**R**SED**T**A VYYCARxxxxxYFDYWGQGT**L**VTVSS (SEQ ID NO: 152)
APGv2_VL2	D*I***Q***L*TQSPSS **LS**AS**V**G**D**RVT ITC*KASQDIY SYLSWF*QQKP GK**A**PK*TLIYR AN RLID*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y***TF**TISSL**QP** E**DIAT**YYC *LQ YDEFPFT* FG**Q** GTKLEIK

	(SEQ ID NO: 153)
APGv2_VH2	Q*V*<u>**Q**</u>L**VQ**SG**S**E L**K**KPGASVK**V** SCKAS *G*<u>*YSF*</u>*T DYN MN*WV**R**<u>**Q**</u>**A** **P**G**QG**LE<u>*WIG*</u>*I IHPNSGTTTY NQKFKG***R**<u>*A*</u>**V**<u>*L*</u>___**S**<u>*V*</u>D<u>*Q*</u>S**V**STAY LQ**IS**SL**KA**ED **T**AVYYC<u>*AR*</u>*SK LRFFDY*WGQG T**L**VTVSS (SEQ ID NO: 154)
APGv4_VH4	Q*V*<u>**Q**</u>L**VQ**SG**A**E **VK**KPGASVK**V** SCKAS *G*<u>*YSF*</u>*T DYN MN*WV**R**<u>**Q**</u>**A** **P**G**QG**LE*WI GI IHPNSGTT TY NQKFKG***R**AT*L* T*V*D<u>*Q*</u>S**T**STAY **ME**L**S**SL**R**SED **T**AVYYC <u>*AR*</u>*SK LRFFDY* WGQG T**L**VTVSS (SEQ ID NO: 155)

<u>Secuencias modificadas genéticamente</u>

Se aplicaron los enfoques de humanización 4D e injerto a las parejas de secuencias de la línea germinal humana descritas anteriormente. Para las secuencias de la cadena ligera modificadas genéticamente, APGv2 contiene las CDR de cadena ligera murina injertadas en la línea germinal IGKV1-33 humana (índice de germinalidad APGv2 = 94% con IGKV1-33-01_IGKJ2-01). Para las secuencias de la cadena pesada modificadas genéticamente, APGv2 y APGv4 contienen las CDR de la cadena pesada murina injertadas en las líneas germinales IGHV7-4-1 e IGHV1-46 humanas respectivamente (índice de germinalidad APG_VH2 = 91% con IGHV7-4-1-02_IGHD6-25-01_IGHJ4-02; índice de germinalidad APG_VH4 = 91% con IGHV1-46-01_IGHD6-25-01_IGHJ4-02). Véase la Tabla 30 de más arriba.

Combinaciones de secuencias variantes de cadenas pesadas y ligeras

Para el injerto, se crearon una versión de la cadena ligera (APGv2_VL2; SEQ ID NO: 153) y dos versiones de la cadena pesada (APGv2_VH2; SEQ ID NO: 154 y APGv4_VH4; SEQ ID NO: 155). APG_VL2 contiene 15 mutaciones derivadas del injerto en la secuencia de la línea germinal humana más próxima y conserva la CDR y los residuos de la zona de Vernier murinos. APG_VH2 contiene 21 mutaciones derivadas del injerto en la secuencia de la línea germinal humana más próxima con una clase canónica coincidente y conserva la CDR y los residuos de la zona de Vernier murinos. APG_VH4 contiene 20 mutaciones derivadas del injerto en la secuencia de la línea germinal humana más próxima y conserva la CDR y los residuos de la zona de Vernier murinos. Las delimitaciones de las CDR de este protocolo de injerto se basan libremente en las diversas definiciones diferentes disponibles en la bibliografía.

* APG_VL2 x APG_VH2 (mutaciones que dirigen la humanización por injerto conservando

las CDR y regiones de Vernier)

* APG_VL2 x APG_VH4 (mutaciones que dirigen la humanización por injerto conservando las CDR y regiones de Vernier)

Se generaron dos variantes de mAPG durante esta campaña de humanización, que se denominaron APGv2 y APGv4. Estas variantes se expresaron y se caracterizaron en varios análisis *in vitro* como se describe a continuación.

Ejemplo 14: Cinética de afinidad de anticuerpos APG por resonancia de plasmón superficial

Se investigó la afinidad con PAI-1 glicosilado humano (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) por medio de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) para APG de ratón y las dos variantes humanizadas (APGv2 y APGv4) utilizando un aparato Biacore 2000 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

En primer lugar, se preparó la superficie de un Chip Sensor CM5 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) utilizando el acoplamiento de amina rutinario para la captura de anti-Fc humano y de ratón (kits anticuerpo Anti-IgG (Fc) humano y anticuerpo anti-IgG de ratón, GE Healthcare). Todos los anticuerpos monoclonales (mAb) se diluyeron hasta 5 nM utilizando tampón de migración HBS-EP. Cada mAb purificado fue capturado durante tres minutos sobre una superficie de la célula de flujo diferente. El PAI-1 humano se inyectó a diversas concentraciones (2,5, 5, 10, 20 y 40 nM) con tiempos de disociación cortos entre ellos y un tiempo disociación largo al final (tiempo de contacto: 120 segundos, disociación corta: 90 segundos; disociación larga: 1800 segundos, velocidad de flujo: 50 µl/min). El chip se regeneró por medio de tampón de glicina-HCl, pH 1,7 después de cada ronda de unión a anticuerpo contra PAI-1. Se realizó el análisis de los datos cinéticos utilizando el soporte lógico Biacore BIAevaluation. Los sensogramas fueron doblemente referenciados restando los valores de la célula de flujo de referencia y los valores del tampón del blanco. Los sensogramas se ajustaron mediante el uso del modelo de cinética simulada 1:1 (Langmuir) con Rmax local. (Véase la Figura 19). Los datos para los tres anticuerpos APG se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31: Cinética de unión mediante análisis inverso Biacore

Anticuerpo		PAI-1 humano	
	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Velocidad de disociación kd (1/s)	Afinidad KD (M)

APG	3,82E+06	4,32E-04	1,131E-10
APGv2	6,58E+06	2,69E-04	4,080E-11
APGv4	9,48E+06	3,59E-04	3,800E-11

Ejemplo 15: Caracterización de anticuerpos APG en plasma humano

Se escrutaron APG de ratón y las variantes humanizadas APGv2 y APGv4 para determinar su capacidad para bloquear PAI-1 de acuerdo con los análisis funcionales descritos en la presente memoria (véanse, p. ej., los Ejemplos 6 y 9, de más arriba). Brevemente, se evaluó la actividad de PAI-1 mediante la capacidad de este serpina para formar un complejo estable con uroquinasa inmovilizada sobre placas de 96 pocillos. Después de lavar el PAI-1 no unido, se detectaron complejos uPA-PAI-1 mediante el uso de anticuerpos policlonales anti-PAI-1. Los anticuerpos anti-PAI-1 policlonales unidos (que son proporcionales al PAI-1 activo en la muestra) se detectaron a continuación, utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Innovation, Núm. Cat. HPAIKT).

Se incubaron diversas concentraciones de variantes humanizadas de APG (APGv2, APGv4) o anticuerpos APG de ratón parentales durante 15 min a temperatura ambiente con plasma humano sin diluir que tenía un elevado nivel de PAI-1 activo. Se determinó el nivel de PAI-1 activo restante utilizando la detección del complejo uPA-PAI-1 por medio de ELISA como se ha descrito anteriormente (véase, p. ej., el Ejemplo 6) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se calculó la inhibición de la actividad de PAI-1 para cada concentración de mAb. El porcentaje de inhibición de la actividad de PAI-1 se representó como una función de la concentración de las variantes humanizadas de APG (APGv2, APGv4) o anticuerpo APG de ratón parental. Se utilizó el soporte lógico de velocidad Biostat para determinar la CI_{50} y la I_{maX} después de tres experimentos independientes (por duplicado) (véase la Figura 20). Los datos se presentan a continuación en la Tabla 32.

Tabla 32: Generación de plasminógeno en plasma humano

Anticuerpo	**CI_{50abs} media ± etm (nM)**	**I_{max} media (%)**
mAPG	1,81	89,7
APGv2	9,62 E-1	94,5
APGv4	1,28	94,4

Ejemplo 16: Análisis de lisis de coágulos en plasma humano: actividad de A44V11,

mAPG, y variante de APG

El sistema fibrinolítico a menudo está alterado en los pacientes con accidente cerebrovascular. Se puede utilizar un análisis de lisis de coágulos para determinar la actividad fibrinolítica mediante la medición del grado de degradación de la fibrina. Véase, en general Lindgren, A. et al. Stroke 27:1066-1071 (1996). Los análisis de lisis de coágulos se han descrito con detalle en otra parte. Véase, por ejemplo, Beebe, et al. *Thromb. Res.* 47: 123-8 (1987); Tilley et al., *J. Vis. Exp*. 0.67: e3822.

La actividad funcional de A44V11 y otros anticuerpos neutralizadores de PAI-1 se determinó utilizando un análisis de lisis de coágulos en plasma humano. Brevemente, el análisis aplicado aquí induce la formación de coágulos utilizando una mezcla de Factor tisular/Ca2+ en presencia de tPA y una concentración de PAI-1 que se sabe que inhibe la lisis de los coágulos. La polimerización de la fibrina induce un aumento de la turbidimetría que fue detectado mediante la medición de la absorbancia a 340 nm. La capacidad del anticuerpo para restaurar la lisis de los coágulos se determinó incubando dosis crecientes de anticuerpo con plasma pobre en plaquetas humano normal.

Brevemente, los experimentos de lisis de coágulos se realizaron en placas de microtitulación. Se incubó plasma humano con citrato añadido (Biopredic International, Rennes, Francia) con anticuerpo anti-PAI-1 o IgG de control de isotipo diluidos en tampón de análisis (NaCl, Tris-HCl pH = 7,4). Después de 15 min de incubación a la temperatura ambiente, se añadió PAI-1 humano glicosilado (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) a una concentración final de 3 nM y se incubó durante 10 min más. Después se añadió t-PA (sctPA, Molecular Innovation) a una concentración final de 1 nM. La formación de coágulos fue inducida por una mezcla de activación que comprendía Tissue Factor (Innovin®, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) diluido a una concentración final de 7,5 mM en tampón de análisis de calcio ($CaCl_2$).

La lectura cinética de la absorbancia a 340 nm se realizó cada 30 seg durante 5 horas con un lector de microplaca iEMS (ThermoFischer) o un SpectrostarNano (BMG Labtech). Para cuantificar el efecto sobre la lisis de los coágulos, se calculó el área bajo la curva (AUC), que refleja el equilibrio entre la formación de coágulos y la lisis de coágulos utilizando soporte lógico GraphPad Prism. La restauración de la lisis de los coágulos después de tratamiento con anticuerpos se determinó de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$\text{Restauración} = 100 \times \frac{AUC_{\text{lisis máx}} - AUC_{\text{tratado}}}{AUC_{\text{sin lisis}} - AUC_{\text{lisis máx}}}$$

La CI_{50} y la I_{max} se calcularon utilizando el soporte lógico de velocidad Biostat.

La concentración 1 nM de t-PA proporcionó la lisis completa del plasma normal en el plazo de 2 horas. La concentración 3 nM de Pal-1 inhibió la lisis de coágulos inducida por t-PA. La adición de cualquiera de t-PA o PAI-1 solos no afectó a la formación de coágulos. Ni la adición de ni t-PA ni la de PAI-1 no afectaron a la formación de coágulos.

El anticuerpo anti- PAI-1 A44V11 restauró la lisis de coágulos en plasma pobre en plaquetas humano (véase la Figura 21), mientras que el isotipo IgG1 no lo hizo (véase la figura 22). A44V11 mostró una CI_{50} de 2 nM con una I_{max} de 103% a 100 nM (véase la Figura 23).

Las variantes humanizadas del anticuerpo anti-PAI-1 APG también restauraron la lisis de coágulos en plasma pobre en plaquetas humano (véase la Figura 24). APGv2 exhibió una CI_{50} de 2,1 nM y una I_{max} de 114% a 100 nM. APGv4 exhibió una CI_{50} de 2,8 nM y una I_{max} de 16% a 100 nM (véase la Figura 25). Los datos de la lisis de coágulos se resumen a continuación en la Tabla 33.

Tabla 33: Inhibición de la lisis de coágulos por anticuerpos anti-PAI-1

Anticuerpo	**CI_{50} (nM)**	**Imax @ 100 nM**
A44V11	1,38	113%
APG V2	2,08	114%
APG V4	2,82	116%
mAPG	2,34	123%

Ejemplo 17: Evaluación de A44V11 Neutralización de PAI-1 en células primarias de pulmón humano

El efecto del anticuerpo A44V11 sobre la neutralización de PAI-1 se investigó en un sistema basado en células de pulmón. Se considera que TGFβ es la citoquina fibrogénica más potente y ubicua. Se ha demostrado que el TGFβ induce la expresión de PAI-1 e inhibe las actividades de t-PA y plasmina así como la degradación de colágeno en fibroblastos de embrión murino cultivados (células NIH3T3). Véase Liu, R.M. *Antioxid Redox Signal*, 10(2): 303- 319 (2008). Se cultivaron en placa las cepas de fibroblastos de pulmón primarios LL29 (CCL-134) y LL97A (CCL-191) de la ATCC (Manassas, Virginia) durante la noche en una placa de 12 pocillos a una concentración de 200.000 células por pocillo. Las células se incubaron durante 48 horas con el anticuerpo A44V11 o el control de isotipo (IgG) y TGFβ (R y D Systems, Minneapolis, Minn., núm. cat.100-B-001) a una concentración de 5 ng/ml. Después de 48 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares y se analizaron por medio transferencia Western para la detección de las formas

de PAI-1 con un pAb anti PAI-1 de conejo (abcam, ab66705).

Las células tratadas con anticuerpo A44V11 después de la estimulación con TGFβ presentan una banda de PAI-1 como un doblete, que corresponde a la forma escindida de Pal-1 (véase la Figura 26, calle 5). Las células tratadas con IgG de control no muestran esta formación en doblete (véase la Figura 26, calle 6). Este estudio demuestra que el tratamiento de las células pulmonares humanas primarias con A44V11 induce la conformación de sustrato de PAI-1 endógeno, lo que permite que PAI-1 sea escindido por la proteasa.

Ejemplo 18: A44V11 aumenta la activación de las MMP

La plasmina puede activar las MMP, enzimas que pueden degradar la mayoría de las proteínas ECM, incluyendo el colágeno, el principal componente proteináceo del tejido fibrótico. En este sentido, la plasmina se cita a menudo como un activador general de las MMP. (Véase Loskutoff, et al. *J. Clin. Invest.* 106(12): 1441-1443 (2000)). PAI-1 disminuye la activación de las MMP y la degradación de la matriz mediante el bloqueo de la generación de plasmina, seguido por la inhibición de la apoptosis de fibroblastos. La capacidad de A44v11 para estimular la activación de las MMP se investigó en un sistema basado en células de pulmón. Se cultivaron en placa fibroblastos de pulmón primarios LL29 (CCL-134) y LL97A (CCL-191) de la ATCC (Manassas, Virginia) durante la noche en una placa de 12 pocillos a una concentración de 250.000 células por pocillo. Las células se incubaron durante 48 horas con A44V11 o control de isotipo (IgG) y Lys-Plasminógeno (Molecular Innovation, núm. cat. HGPG-712) a una concentración de 0,1 μM. Después de 48 horas, los sobrenadantes celulares se cosecharon y se detectaron las actividades de una variedad de MMP (incluyendo, por ejemplo, MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, y 14) utilizando un kit Sensolyte 520 Generic MMP Assay kit (AnaSpec, Fremont, CA, núm. cat. 71158) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en la Figura 27, A44V11 estimula la activación de las MMP dependientes de plasmina en fibroblastos de pulmón humanos. El gráfico muestra dos experimentos separados representativas. Las células tratadas con A44V11 y plasminógeno mostraron sustancialmente una mayor activación en comparación con las células tratadas con un anticuerpo lgG1 negativo. Este estudio demuestra que A44V11 estimula la activación de las MMP en un fenómeno mediado por plasmina.

Ejemplo 19: Análisis de la potencia de A44V11 en el modelo de ratón de fibrosis pulmonar (sensibilización con bleomicina)

La fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina es un modelo bien estudiado de la fibrogénesis apoyado por una amplia literatura. Este modelo de fibrosis pulmonar se asemeja a la observada en los seres humanos y se ha utilizado para evaluar los efectos de agentes terapéuticos potenciales, así como en la investigación básica, (véase, p. ej., Molina-Molina et al. *Thorax* 61: 604-610 (2006)).

Estudio farmacodinámico en ratones tratados con bleomicina (modelo de fibrosis)

Se generaron ratones transgénicos que expresan PAI-1 humano (ratones trangénicos con PAI-1 humanizado) sustituyendo las CDS (exones e intrones) del gen de PAI-1 de ratón (SERPINE1) (NCBI Núm. Ref. NM 008871) por la correspondiente CDS del gen de PAI-1 de tipo salvaje humana (NCBI Núm. Ref. NM_000602.3; NC_000007.13) (véase Klinger, K.W. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8548 (1987)) bajo el control de las secuencias reguladoras del gen PAI-1 de ratón endógenas en ratones C57BL/6 x 129 ratones (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). La clonación molecular y la generación de ratones transgénicos se realizan de acuerdo con las técnicas convencionales y de acuerdo con las instrucciones del fabricante y de los criadores. La expresión de PAI-1 humano y la no expresión de PAI-1 de ratón se confirmaron en ratones homocigotos. Se confirmaron los niveles tanto de ARNm como de proteína mediante qPCR convencional y mediante ELISA, respectivamente. Para estos procedimientos se utilizaron ratones transgénicos para PAI-1 humanizados homocigotos hembra de edades comprendidas entre 8-9 semanas y con un peso de 22-25 g. Se proporcionaron *ad libitum* alimentos para roedores y agua.

Los ratones recibieron 50 µl de Bleomycin® (Sanofi, Francia) disuelta en NaCl al 0,9% por inyección intra-traqueal a través de un microspulverizador a una dosis de 2 mg/kg. Los ratones de control recibieron 50 µl de NaCl al 0,9%. Para estos procedimientos, los ratones se anestesiaron con isoflurano (TEM, Lormont, Francia) por inhalación y luego se intubados con una cánula 18G. La cánula se conecta a un ventilador alimentado con una mezcla de oxígeno/isoflurano para mantener la anestesia. Después de anestesia, el micropulverizador se introdujo en la cánula para la inyección de bleomicina directamente en los pulmones. Los ratones fueron entonces extubados y se les permitió recuperarse de la anestesia. El día 4, después de la aleatorización en 3 grupos, los ratones se trataron una vez por medio de administración intra-peritoneal con cualquiera de A44v11 IgG1 de ratón de control negativo a 10 mg/kg en PBS (1 mg/ml).

En los puntos de tiempo designados (día 7 o día 9) después de la estimulación con bleomicina, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de xilazina/ketamina y

sacrificados por una apertura en el pecho. Se realizó una recogida de sangre mediante cosecha intra-cardiaca en un tubo recubierto de citrato. Los bronquios del lado izquierdo y el pulmón izquierdo se eliminaron y se fijaron con un fijador (FineFix®, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) bajo presión controlada para el análisis histológico. A continuación se colocó una cánula en la tráquea para el procedimiento de lavado bronco-alveolar (BAL) (1,5 ml de NaCl al 0,9% inyectado y recogida en tres inyecciones de 0,5 ml). Los cuatro lóbulos del pulmón derecho fueron recogidos a continuación, cortados en dos piezas y lisados para el análisis de proteínas. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los mínimos éticos europeos y fueron aprobados por el comité de ética interno (CEPAL, sanofi).

Se determinaron los niveles de A44V11 utilizando un ELISA (Molecular Innovation, núm. cat. HPAIKT) con placas de PAI-1 humano biotiniladas recubiertas y se detectaron utilizando anti-IgG de ratón secundario marcado con Sulfo-Tag (MesoScale Discovery, Gaithersburg, Maryland). Para el día 7, los ratones se trataron con A44V11, el resultado fue 200 nM en el plasma, 11 nM en BALF y 12 nM en producto lisado de pulmón.

Como se muestra en la Figura 28, la administración de una dosis única intraperitoneal (10 mg/kg) de A44V11 al día 4 alcanza una inhibición casi completa de PAI-1 activo humano tanto en fluido BAL como en producto lisado de pulmón en los animales sacrificados el día 7 después de la estimulación con bleomicina. Para los animales del día 9, A44V11 (10 mg/kg) logra una inhibición casi completa de PAI-1 activo humano en productos lisados de pulmón, pero logra solamente una inhibición parcial en BALF.

Se pueden medir los dímeros D, un producto de degradación de la fibrina, para evaluar el grado de degradación de la fibrina. Para medir la degradación de la fibrina, se detectaron los niveles de dímero D en BALF por medio de ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago, Asnieres, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de dímero D en el BALF del grupo tratado con A44V11 aumentaron aproximadamente 2,8 veces en el día 7 y 1,6 veces el día 9 en comparación con el grupo de control negativo con IgG1, lo que sugiere que el tratamiento con A44V11 aumenta la degradación de fibrina (véase la Figura 29).

Se llevaron a cabo estudios adicionales para evaluar más a fondo la actividad de A4411 en la reducción de la fibrosis en el pulmón de ratón estimulado con bleomicina. Para estos estudios, los ratones se sometieron a un protocolo similar al del estudio farmacodinámico descrito anteriormente, excepto que la duración del estudio fue de 21 días desde la estimulación con bleomicina, y el tratamiento con el anticuerpo (ya sea

A44V11 o anticuerpo de control IgG1 a 10 mg/kg) se repitió cada 3 días empezando el día 4 hasta el día 20. El día 21 después de la estimulación con bleomicina, se sacrificaron los animales como se describió anteriormente.

Se sabe que el aumento de peso del pulmón es un indicador del aumento de la fibrosis. Se determinó el peso del pulmón derecho, como una medida de la fibrosis, para los ratones en todos los grupos experimentales. Como se muestra en la Figura 30, la instilación de bleomicina induce un aumento del peso del pulmón derecho que fue parcialmente inhibido por la administración repetida del anticuerpo A44V11 a 10 mg/kg. La administración repetida utilizando el anticuerpo de control negativo IgG1 no inhibió el aumento de peso del pulmón derecho debido a la estimulación con bleomicina. La reducción en el aumento de peso del pulmón derecho inducido por bleomicina en ratones tratado con A44V11 fue estadísticamente significativa en comparación con ratones inducidos por bleomicina de una manera similar que fueron tratados con anticuerpo de control negativo IgG1 ($p < 0,001$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Newman-Keuls. Este resultado indica que A44V11 inhibe la fibrosis inducida por bleomicina en el pulmón de ratón con PAI-1 humanizado, mientras que un anticuerpo IgG1 de control no lo hace.

La acumulación de colágeno en el pulmón es otro indicador conocido de la fibrosis. Para analizar la acumulación de colágeno, los tejidos pulmonares de los ratones sacrificados el día 21 se prepararon y se separaron mediante HPLC, seguido de la medición de hidroxiprolina. Esta técnica se detalla en otro lugar, por ejemplo Haitori, et al., *J Clin Invest.* 106 (11): 1341-1350 (2000). En resumen, el tejido pulmonar se preparó por hidrólisis en condiciones ácidas (HCl 6M) durante 22 horas a 105°C, seguido de evaporación. Las aminas primarias fueron bloqueadas en el tejido pulmonar por OPA (ftalaladehído), y las prolina/hidroxiprolinas se marcaron específicamente utilizando NBD (4-cloro-7-nitrobenzofurazano) (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA). Los productos hidrolizados se separaron a continuación en columnas Synergi™ 4 µm Hydro-RP 80 Å, Columna LC 150 x 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, núm. cat. 00F-4375-Y0) utilizando HPLC (Shimazu Corp., Kyoto, Japón) bajo un gradiente de acetonitrilo. Se utilizaron curvas patrón de cantidades conocidas de hidroxiprolina como referencia para cuantificar los picos. Una representación de los datos cuantificados se muestra en la Figura 31.

La acumulación de colágeno en el pulmón detectada por el contenido de hidroxiprolina se incrementó en animales estimulados con bleomicina. Este aumento en la acumulación de colágeno pulmonar se redujo estadísticamente ($p < 0,08$) por la dosificación repetida de anticuerpo A44V11 a 10 mg/kg. (véase la Figura 31). La

dosificación repetida utilizando el anticuerpo de control negativo IgG1 no inhibió el aumento en la acumulación de colágeno pulmonar debido a la estimulación con bleomicina. La reducción en el incremento de acumulación de colágeno inducida por bleomicina en ratones tratados con A44V11 fue estadísticamente significativa en comparación con ratones inducidos por bleomicina de un modo similar que fueron tratados con anticuerpo de control negativo IgG1 ($p < 0,05$). Los ratones tratados con A44V11 mostraron aproximadamente 44% menos de aumento en la acumulación de colágeno que los ratones de control tratados con IgG1.

Ejemplo 20: Evaluación de la actividad de A44V11 en el modelo de estimulación con LPS en monos

Se aplicó un modelo de estimulación aguda con lipopolisacáridos (LPS) en monos para determinar la eficacia de neutralización de PAI-1 de A44V11 *in vivo*. El modelo de estimulación con LPS es descrito por Hattori, et al. *J Clin Invest.* 106 (11): 1341-1350 (2000). Se evaluó la actividad del mAb A44V11 en PAI-1 en muestras de plasma e hígado de mono. En concreto, el experimento se diseñó para evaluar el impacto de una dosis alta de LPS (100 µg/kg - IV) sobre los niveles en plasma y tejidos de PAÏ-1 en el mono anestesiado pre-tratado (24 horas antes), ya sea con A44V11 (5 mg/kg, IP) ya sea con IgG1 (control negativo, 5 mg/kg, administración intraperitoneal). Los experimentos se realizaron de acuerdo con los mínimos éticos europeos y fueron aprobados por el comité ético interno (CEPAL, sanofi).

Se privaron de comida durante la noche Cynomolgus Macaca fascicularis (machos y hembras) con un peso de 4 a 9 kg antes de la anestesia a largo plazo (por lo menos 8 horas), incluyendo IM inducción con Zoletil 50 (Virbac, Taguig City, Filipinas) a 0,12 - 0,16 ml/kg seguido de la inhalación de una mezcla gaseosa de aire/oxígeno e isoflurano (1 a 3%). La temperatura del cuerpo del mono se mantuvo dentro de los rangos fisiológicos utilizando una almohadilla térmica. Después de la cateterización, se administró el LPS (Serotype 0127-B8) en forma de embolada de 1 min en la vena cefálica accesoria a una dosis de 100 µg/kg (0,4 mL/kg). En varios puntos de tiempo, se tomaron muestras de sangre y muestras de hígado. Las muestras de sangre (en citrato/EDTA) se recogieron y se centrifugaron para aislar el plasma pobre en plaquetas. Las biopsias hepáticas y las necropsias terminales se almacenaron a -80°C.

Se determinaron los niveles de PAI-1 activo, dímero D y plasmina-α2-antiplasmina por medio de análisis ELISA disponibles comercialmente (Mol. Innovation, núm. cat HPAIKT; Asserachrom D-Dimer; Plasmin-A2 antiplasmin, Diagnostica Stago) de acuerdo

con las instrucciones del fabricante.

En el plasma, el nivel de PAI-1 activo disminuye desde aproximadamente 30 ng/ml hasta por debajo de 10 ng/ml en todos los monos a los que se ha administrados A44v11. (Véase la Figura 32(A)). No hubo aumento en los niveles de PAI-1 activo después de la administración del LPS (100 µg/kg). (Véase la Figura 32(A). En contraste, los monos tratados con control de IgG1 negativo muestran un fuerte aumento en los niveles de PAI-1 activo después de la administración de LPS, con un máximo que se produce a aproximadamente 4 horas (aproximadamente 50 a aproximadamente 250 ng/ml). (Véase la Figura 32(B)). Por lo tanto, el tratamiento con el control negativo IgG1 no reduce los niveles de PAI-1 activo en plasma que se incrementaron fuertemente después de la administración de LPS. (Véase la Figura 32(B)).

En los productos lisados de biopsia de hígado, se observó un fenómeno similar. Los monos que fueron tratados con mAb A44V11 no mostraron un aumento de los niveles de PAI-1 activo tras el tratamiento con LPS. (Véase la Figura 33(A)). En contraste, la administración de LPS indujo una fuerte incremento de PAI-1 activo (hasta 3 ng/mg) en productos lisados de biopsia de hígado de monos tratados con control negativo IgG1 (véase la Figura 33(B)).

De manera simultánea a la neutralización de PAI-1, se encontró que los niveles de dímero D en monos tratados con A44V11 (véase la Figura 34(A)) eran generalmente más altos que en los monos tratados con IgG de control negativo (véase la Figura 34(B)) lo que sugiere que el tratamiento con A44V11 en monos también induce un aumento de la degradación de fibrina en plasma.

Finalmente, las muestras de plasma de monos tratados con A44V11 mostraron un mayor nivel de complejos de plasmina-α2-antiplasmina (PAP) en comparación con los niveles de PAP en monos tratados con IgG de control negativos (véase la Figura 35(A) y (B)). El aumento del complejo PAP y el dímero D en presencia de A44V11 indica aumentos en la generación de plasmina.

Ejemplo 21: Evaluación de la actividad A44V11 en el modelo de ratón de adherencia abdominal

Se evaluó el efecto del tratamiento con anticuerpo anti-PAI-1 A44V11 sobre la formación de adherencias en un modelo de cuerno uterino de ratón de lesión quirúrgica. El procedimiento de aproximación y electrocauterización en cuerno uterino de ratón altera la superficie serosa, causa daño térmico al tejido uterino, y aproxima las superficies de tejidos dañados durante el proceso de curación que finalmente da como resultado

adherencias postquirúrgicas en el 100% de los animales no tratados. El modelo y el procedimiento quirúrgico han sido descritos previamente por Haney A.F. et al., (1993). *Fertility and Sterility*, 60(3): 550-558.

Para estos estudios de adherencia, se utilizaron ratones hembra transgénicos generados anteriormente que expresan el transgén de PAI-1 humanizado, de aproximadamente 9 semanas de edad, con un peso aproximado de 20 g. Se dividieron cuarenta y dos ratones hembra transgénicos maduros en dos grupos y se sometieron al procedimiento quirúrgico diseñado para crear adherencias entre los cuernos uterinos (UH), como describen con detalle Haney A.F. et al., (1993). Brevemente, cada animal se anestesió con isoflurano para la cirugía de acuerdo con las directrices del IACUC, y se realizó una laparotomía media de rutina a aproximadamente 1,0 cm caudal con respecto al proceso xifoides. Los UH se identificaron, se aproximaron medialmente con una sola sutura de Proleno 7-0 (Ethicon Inc., Somerville, N.J.) cuidadosamente colocada a través de la pared muscular de cada cuerno, y los cuernos se sujetaron juntos inmediatamente por debajo de la unión de los oviductos en la unión útero-tubárica. Se tuvo cuidado de no dañar el suministro vascular del ovario. Para inducir lesiones por electrocauterización, se utilizó una unidad de electrocauterización bipolar (Valley Lab Surgistat, Solid State Electrosurgery Unit, Modelo No. B-20) sobre las superficies mediales de cada cuerno uterino, cubriendo un área de aproximadamente 2x6 mm. La unidad de cauterización se ajustó de la siguiente manera: 100 Volts, 130 Hz, 50 - 60 amperios. Se utilizó una punta de cauterización de 3 mm de ancho con corriente de coagulación pura a un ajuste de 3, se inició la aplicación de energía y se tocó el tejido durante 1 segundo con dos puntos de quemadura por cuerno. La incisión del músculo se cerró con aguja cónica BV-1 Vicryl 5-0 (Ethicon Inc.) en un patrón de sutura continua. La piel se cerró con aguja cónica BV-1, Prolene 5-0 (Ethicon Inc.), en un patrón de sutura de colchonero horizontal.

Tras la creación de la lesión en el UH, los animales del Grupo 1 fueron tratados con un volumen de 0,16 ml de un anticuerpo de control de isotipo (30 mg/kg), que se aplicó a las quemaduras de cauterización. Los animales del Grupo 2 fueron tratados con un volumen de 0,16 ml de anticuerpo A44V11 (30 mg/kg) de la misma manera. Para cada grupo, los animales se sacrificaron a las 6 horas (n = 5), 72 horas (n =), o el día 7 (n = 12). (Véase la Tabla 34 a continuación). A los animales que fueron programados para la eutanasia a las 72 horas y el Día 7 recibieron una segunda dosis de anticuerpo (30 mg/kg) inyectado por vía intraperitoneal (IP) 48 horas después de la cirugía.

Tabla 34: Programa de tratamiento para estudios de lesión en el cuerno uterino.

Grupo	Tratamiento	Momento de la Eutanasia	Núm. de Animales	Dosificación (30 mg/kg)
Grupo 1	mAb de control de isotipo (0,16 mL)	6 horas	5	Tiempo 0
		72 horas	4	Tiempo 0 + 48 horas
		Día 7	12	Tiempo 0 + 48 horas
Grupo 2	mAb humanizado anti-PAI-1 A44 (0,16 mL)	6 horas	5	Tiempo 0
		72 horas	4	Tiempo 0 + 48 horas
		Día 7	12	Tiempo 0 + 48 horas

Nota: Todos los animales tenían el cuerno uterino aproximado por sutura y quemaduras por cauterización creadas antes del tratamiento.

Evaluación y análisis de la eficacia:

Los animales se sacrificaron en los momentos indicados y se evaluó la formación de adherencias. En pocas palabras, se midió la longitud de los cuernos a partir de la bifurcación uterina hasta la sutura de aproximación colocada justo por debajo de los oviductos. Las dos suturas externas que rodean los cuernos uterinos se eliminaron y se midió la longitud de la adherencia entre los cuernos uterinos con la ayuda de un microscopio, se documentó, y se anotó la presencia o ausencia (Sí/No). Asimismo, se registrará cualquier tejido involucrado en la formación de adherencias, pero pueden no estar incluidos en la longitud del área adherida. Se comprobó la normalidad de la distribución del porcentaje promedio de longitud adherida entre los cuernos uterinos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los grupos se compararon entre sí utilizando el análisis de Tukey Kramer si se distribuían normalmente y el análisis de la suma de rangos de Wiicoxon si no se distribuían normalmente. En todos los casos, un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los animales tratados con A44V11 mostraron un porcentaje significativamente más bajo de longitud de la formación de adherencias entre los cuernos uterinos aproximados (véase la Tabla 35)

Tabla 35. Resultados de la medición de la longitud del Cuerno Uterino.

Grupo	N	% de Longitud de adherencias entre los cuernos uterinos (Media ± ETM)
mAb de control de isotipo (0,16 mL)	12	84 ± 3
mAb A44V11 (0,16 mL)	11	61 ± 7* (p=0,02)

* p = estadísticamente significativa en relación con el control de isotipo por el análisis de suma de rangos de Wiicoxon, Aproximación Chi cuadrado

Detección de los niveles de PAI-1 y tPA activos

Después de la eutanasia, se recogieron muestras de sangre (plasma), fluido intraperitoneal (IPF), y cuerno uterino de los animales para su evaluación. La recogida de muestras se llevó a cabo utilizando técnicas convencionales. Se evaluaron las muestras de plasma, IPF, y cuerno uterino para determinar los niveles de PAI-1 y tPA activos utilizando ELISA. (Human PAI-1 Activity ELISA kits. Núm. Cat. HPAIKT, Molecular Innovation, Novi, MI). Los datos se procesaron utilizando Excel, IMP, y el soporte lógico Prism Graph Pad. En todos los casos, un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. En el punto temporal de 6 horas y Día 7, se encontró que los niveles de PAI-1 activo disminuían en el fluido IP y en los productos lisados de cuerno uterino en los animales tratados con A44V11 vs el control de isotipo. (Véase la Figura 36). La disminución de los niveles de PAI-1 activo en el IPF a las 6 horas fue un resultado estadísticamente significativo mostrado en el fluido IP en el punto temporal de 6 horas en los animales tratados con A44 versus control de isotipo ($p < 0,001$ por la prueba de la t de Student).

Ejemplo 22: Estructura cristalina del anticuerpo humanizado A44V11

Expresión y purificación de Fab A44V11

Se obtuvo Fab recombinante (rFab) de células HEK293 transfectadas transitoriamente, utilizando dos plásmidos que codificaban la cadena ligera o la cadena pesada etiquetada con His C-terminal. Después de la centrifugación y la filtración, se aplicó rFab del sobrenadante celular a una resina de afinidad inmovilizada en metal. Después de la elución de la resina, rFab se sometió a diálisis extensamente frente a PBS

y se almacenó a 4°C.

Fuente de PAI-1 de Macaca fascicularis, referido como PAI-1 de cynomolgus o cyno:

Se expresó PAI-1 de cinomolgo recombinante maduro PAI-1 (24-402) como cuerpos de inclusión en E. coli y la proteína recombinante se purificó utilizando métodos convencionales.

Fuente de PAI-1 humano:

Se adquirió PAI-1 recombinante humano maduro (24 a 402) de Molecular Innovations Inc. (número de catálogo CPAI). Se estabilizó en conformación activa mediante la introducción de mutaciones (N150H, K154T, Q319L, M354I), como describen Berkenpas et al. (1995, EMBO J., 14, 2969-2977).

Preparación y purificación de los complejos:

Se mezclaron Fab recombinante y antígeno a una razón molar 1,5:1, se incubaron 30 min a la temperatura ambiente, y los complejos se purificaron adicionalmente por medio de exclusión por tamaño preparativa sobre una columna Superdex 200 PG (GE Healthcare), equilibrada con MES 25 mM pH 6,5, NaCl 150 mM.

Cristalización del complejo de Fab A44V11 + PAI-1 de Cyno

El complejo se concentró a 10 mg/ml en MES 25 mM pH 6,5, NaCl 150 mM. Éste cristaliza en etanol del 16-24%, Tris 100 mM pH 8,5. Se utilizó etilenglicol (30%) como crioprotector. Los cristales se difractaron a aproximadamente 3,3 Å en el grupo espacial P321 (a = b = 193Å, c = 144Å) en la línea de luz ID29 del ESRF. Los datos se procesaron con una combinación de XDS y Scala (GlobalPhasing Ltd., Cambridge, Reino Unido).

Determinación de la estructura del complejo de Fab A44V11/Cyno-PAI-1:

Se construyó un modelo del dominio variable de Fab utilizando Prime in Maestro (Schrodinger, Nueva York, NY). El dominio constante se obtuvo de la estructura publicada 3FO2. Se utilizaron dos modelos diferentes de PAI-1 humano: la conformación latente se obtuvo de 1LJ5, la conformación activa de 1OC0. El cálculo del coeficiente de Matthews (V_M, volumen de cristal por unidad de peso molecular de proteína) sugiere que hay hasta cuatro complejos en la unidad asimétrica (V_M 2.2 asumiendo un tamaño de complejo de 90 kilodalton (KD). El Reemplazo Molecular se realizó utilizando Phaser (paquete CCP4) (McCoy, et al., *J. Appl. Cryst.* 40: 658 - 674 (2007), que identificó dos monómeros de PAI-

1 latente y dos dominios variables de Fab. La densidad adicional era claramente visible para los dominios constantes, que tuvieron que ser colocados manualmente. Esta solución, que corresponde a una V_M de 4,3 (disolvente al 71%), también fue examinada cuidadosamente para determinar la consistencia del embalaje. La estructura se perfeccionó con Buster (GlobalPhasing) utilizando la simetría no cristalográfica, para un Rlibre de 29,2% (Rfactor 25,8%). Los dominios constantes no se estabilizan por empaquetamiento cristalino y están mal resueltos en el mapa de densidad electrónica.

Cristalización del complejo de Fab A44V11 + PAI-1 humano

La cristalización de proteínas es un cuello de botella de la determinación de la estructura biomolecular mediante métodos de cristalografía de rayos x. El éxito en la cristalización de proteínas es directamente proporcional a la calidad de las moléculas de proteína utilizadas en los experimentos de cristalización, donde los criterios de calidad más importantes son la pureza y la homogeneidad (tanto molecular como conformacional) de las proteínas en solución.

Inicialmente, para determinar la estructura del complejo de PAI-1/Fab de mAb se utilizó un mAb A44 nativo para preparar su fragmento Fab por medio de digestión con papaína. Esta preparación de Fab a escala dio como resultado fragmentos Fab heterogéneos que fueron complejados y purificados en forma de complejo con proteína PAI-1 (wt) de tipo salvaje humana. El complejo de proteína obtenido se concentró a 7 mg/ml de concentración y se escrutó para determinar la cristalización bajo 800 condiciones de cristalización individuales a dos temperaturas diferentes, 4°C y 19°C. No se detectaron resultados de cristalización. Con el fin de mejorar la homogeneidad del complejo de proteína, se produjo Fab de A44 etiquetado con 6-His, se purificó y se complejó con la proteína PAI-1 de tipo salvaje humana (véase la Figura 36).

El escrutinio de cristalización del complejo dio como resultado en primer lugar resultados de cristalización en Condiciones de PEG10K al 20% + Acetato de sodio 0,1 M pH 4,6. La optimización de la cristalización por métodos de cristalización convencionales, Microseed Matrix Seeding, y cristalización por tripsinolisis *in situ* no mejoraron significativamente la calidad de los cristales. Los mejores cristales obtenidos fueron de tipo aguja y se sometieron a difracción con rayos X con una resolución insuficiente para la determinación de la estructura (10Å).

El fracaso con la cristalización de los cristales del complejo podría explicarse potencialmente por la heterogeneidad conformacional del complejo. Se sabe que la molécula de PAI-1 de tipo salvaje adopta tres conformaciones distintas (activa, latente y

sustrato) que pueden interferir en la cristalización. Para mejorar la calidad de los cristales, se produjo Fab de A44 etiquetado con 6-His en complejo con PAI-1 latente (véase la Figura 37).

Se produjo el complejo correspondiente y se escrutó para determinar la cristalización de novo y en las condiciones utilizadas anteriormente para el complejo Fab de A44 etiquetado con 6-His/proteína PAI-1 wt. El único resultado de cristalización de las más de 1000 condiciones sometidas a ensayo se identificó para el complejo en las condiciones de PEG3350 al 20% + acetato de NH4 0,2 M + MPD al 4% + Mes 50 mM pH 6 (véase la Figura 39 (a)). Después de una optimización exhaustiva 3D se obtuvieron los cristales. Los ensayos de difracción de rayos X utilizando un haz de rayos X de alta intensidad en un sincrotrón no mostraron ninguna señal de difracción (véase la Figura 39(b), que representa cristales optimizados representativos).

Para reducir la flexibilidad de las porciones de proteína, se decidió producir el fragmento Fab de A44 recombinantemente pero sin una etiqueta artificial tal como la etiqueta 6-His utilizada anteriormente. Para aumentar aún más las posibilidades de éxito de la cristalización, se adquirió una forma mutante activa de PAI-1 (N150H, K154T, Q319L, M3541) de Molecular Innovations (Núm. Cat. CPAI, Novi, MI) y se utilizó para la preparación del complejo con la proteína Fab de A44 que carece de etiqueta artificial. El complejo se concentró a 12 mg/ml en MES 25 mM pH 6,5, NaCl 150 mM. Se obtuvieron cristales individuales aceptables en forma de varilla en PEG3350 al 10%, sulfato de amonio 100 mM y se crioprotegieron mediante la adición de etilenglicol al 30% (véase la Figura 40). Estos cristales difractan a una resolución de 3.7Å, y después de una optimización por crioprotección exhaustiva, se produjo un conjunto de datos de difracción de rayos x adecuados para la determinación de la estructura (3,3 Å). Se recogió un conjunto de datos a 3,3 Å en una línea de luz Proxima 1 del sincrotrón SOLEIL (Saint-Aubin, Francia). El grupo espacial es P212121 (a = 105, b = 152, c = 298). Los datos se procesaron utilizando comandos XDSme (XDS ref, Xdsme ref).

Determinación de la estructura del complejo de Fab de A44V11/PAI-1 humano:

No tiene sentido (CCP4) indicar sólo una confianza del 40% en la identificación del grupo espacial. En consecuencia, se llevó a cabo el Remplazo Molecular inicial con Amore (CCP4) para someter a ensayo todas las variantes posibles de grupo espacial del grupo puntual P222: P212121 fue confirmado sin ambigüedades. El Reemplazo Molecular final con Phaser (Phaser, CCP4) identificó cuatro dímeros de PAI-1 activo/dominio del Fab en la unidad asimétrica. Los dominios constantes se añadieron manualmente en el mapa

de densidad electrónica. La estructura fue perfeccionada con Buster (Global Phasing) utilizando la simetría no cristalográfica, a un Rlibre de 28% (Rfactor 24,1%).

Análisis estructural de epítopos y parátopos

Se identificaron las regiones de epítopos y parátopos formadas en los complejos de cyno y humanos, y se compararon los complejos. Las estructuras cristalinas se determinaron a 3,3 Å para A44V11 en el complejo con PAI-1 humano y de cyno. La superposición de ambas estructuras (véase la Figura 40) muestra que el parátopo de A44V11 es similar para las formas tanto latente como activa de PAI-1. Fab A44 reconoció la forma activa de PAI-1 humano y la forma latente de PAI-1 de cyno. La Figura 42 representa el epítopo de PAI-1 reconocido por Fab A44 tanto en PAI-1 humano activo (Figura 42(A)), como en PAI-1 de cyno latente (Figura 42(B)). El parátopo que reconoce la conformación latente es parte del parátopo que reconoce la conformación activa.

PAI-1 interacciona principalmente con la cadena pesada de A44V11, como se puede observar a partir del análisis de las áreas de superficie de interacción. El área de superficie de la interacción entre PAI-1 humano activo y la cadena pesada (promedio de 4 complejos) es de 674Å^2. El área de superficie de la interacción entre PAI-1 humano activo y la cadena ligera (promedio de 4 complejos) es de 372Å^2. El área de superficie de la interacción entre PAI-1 de cyno latente y la cadena pesada (promedio de 2 complejos) es de 703Å^2. El área de superficie de la interacción entre PAI-1 de cyno latente y la cadena ligera (promedio de 2 complejos) es de 360Å^2 . Véanse las Figuras 43 y 44 para las representaciones de los parátopos de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

Los residuos de la parte del parátopo de A44V11 se muestran a continuación en la Tabla 36. Los residuos en cursiva están involucrados en las interacciones con PAI-1 activo, pero no con la forma latente, mientras que los residuos subrayados interaccionan sólo con la forma latente. El resto de residuos están involucrados en ambas interfaces.

Tabla 36: Residuos de A44V11 involucrados en el parátopo con PAI-1

Localización	**Residuos**
Cadena Pesada (Figura 43)	
Bucle H1	*Thr30*, Asn31, Gly32, Tyr33 y Asn35
Bucle H2 y hebras β vecinas	Tyr47, Tyr50, Thr52, Tyr53, Ser54, <u>Gly55</u>,

	Ser56, *Thr57* y *Tyr58*
Bucle H3	Trp98, Tyr100 y Tyr104
Cadena Ligera (Figura 44)	
Bucle L1:	Asn30 y Tyr32
Bucle L2:	Arg50 y Arg53
Bucle L3:	Tyr91, Asp92, *Glu93*, Phe94 y Pro96

A pesar de las diferentes conformaciones de las moléculas de PAI-1 humano y de cyno, los mismos residuos están implicados en las interacciones con el Fab de A44 (los residuos en negrita mostrados a continuación en la secuencia humana de PAI-1) (SEQ ID NO: 1):

VHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTGG**E**TQ**Q**QIQ AAMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMPHFFRLFRS TVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISHLLGTGAVDQ**L**T**R**LVLVNALYFNGQWKTPF PDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAA PYEKEVPLSALTNILSAQLISHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGM**TD**MF**R QFQADFT**SLS**DQEPL**HVALALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIIDRPFLFVV RHNPTGTVLFMGQVMEP

La forma abreviada para el epítopo de unión de A44V11 para PAI-1 humano es la siguiente:

E-X-X-Q (SEQ ID NO: 156);

L-X-R (SEQ ID NO: 157);

T-D-X-X-R-Q-F-Q-A-D-F-T-X-X-S-D-Q-E-P-L (SEQ ID NO: 158)

En resumen, los epítopos de cyno y humano de FABA44 que reconocen PAI-1 son idénticos en ambas conformaciones. El Fab de A44 reconoce tanto PAI-1 humano como de cyno, pero probablemente el PAI-1 de ratón o rata.

Ejemplo 23: Determinación de la especificidad de A44V11 y reactividad cruzada

Para determinar la especificidad y reactividad de A44V11, se utilizó la secuencia del epítopo de A44V11 (véase más arriba) para buscar epítopos similares en otras proteínas empleando una búsqueda de motivos con la base de datos ScanProsite (SIB Swiss Institute of Bioinformatics). Para más detalles véase Artimo, P. et al. *Nucleic Acids*

Res 40 (W1): W597-603 (2012) Todas las coincidencias en la secuencia del epítopo localizadas en la búsqueda se relacionan con PAI-1, lo que sugiere que el anticuerpo A44V11 es específico para PAI-1.

El epítopo de A44V11 también se comparó con otras estructuras de rayos x conocidas (búsqueda 3D) utilizando el perfilado *in silico* y el modelado molecular de acuerdo con Med-SuMo, que detecta y compara las funciones bioquímicas en las superficies de las proteínas, incluyendo los bonos ejemplo puentes de hidrógeno, cargas, grupos hidrófobos y aromáticos. El modelado molecular por medio de Med-SuMo es descrito adicionalmente por Jambon, et al. *Bioinformatics* 21(20): 3929-30 (2005). La búsqueda 3D del epítopo de A44V11 localizó un motivo similar en la alfa-1-antitripsina (AAT1) humana. Sin embargo, tras la investigación adicional, se encontró que el motivo AAT1 tenía diferencias significativas entre el epítopo de A44V11, de tal manera que es poco probable que A44V11 se una. Por lo tanto, el patrón de secuencia y el análisis del patrón 3D del epítopo de A44V11 sugieren que debe haber una mínima reactividad cruzada con otras proteínas humanas.

Los epítopos de PAI-1 humano y de cyno para A44V11 se compararon con epítopos propuestos de PAI-1 de ratón y rata. Las secuencias se extraen del SEQ ID NO: 1 (PAI-1 humano), SEQ ID NO: 162 (PAI-1 de cyno), SEQ ID NO: 163 (PAI-1 de ratón), y SEQ ID NO: 164 (PAI-1 de rata). El PAI-1 de rata y ratón tienen, respectivamente, una identidad de secuencia de 75% y 79% con PAI-1 humano. El alineamiento de las diferentes secuencias de PAI-1 mostró diferencias significativas entre la secuencia de rata/ratón y humano/cyno en sus respectivos epítopos, lo que sugiere que es poco probable que A44V11 reconozca PAI-1 de rata o ratón (Véase la Figura 45). Por ejemplo, los aminoácidos de PAI-1 de ratón Ser300, Thr302, Gln334 son diferentes de las contrapartes de PAI-1 humano/cyno. Las diferencias en estos residuos representan un cambio en los epítopos propuestos, de tal manera que PAI-1 de ratón no puede ser reconocido por A44V11. La comparación estructural del PAI-1 de ratón con la estructura del complejo de PAI-1 humano/A44V1 (Figura 46) indica además que no debería ser posible obtener actividad en ser humano ni en ratón del anticuerpo A44V11.

Con el fin de validar el epítopo identificado para A44V11, se compararon los epítopos para A44V11 humano y de cyno con las regiones de unión a vibronectina. La estructura de PAI1 humano en complejo con el dominio somatomedina B de vibronectina ha sido publicada (1OC0). Las estructuras de estos dos complejos se compararon (véase la Figura 47). La comparación estructural sugiere que la unión de A44V11 no tendrá un impacto en la interacción de PAI-1 con la vibronectina.

El epítopo para A44V11 se comparó con los epítopos de otros anticuerpos anti-PAI1 publicados. No se encontró solapamiento de los epítopos para A44V11 con otros anticuerpos anti-PAI-1 publicados MA-55F4C2 y MA-33H1, que se unen a los residuos en la región 128-156 (véase Debrock et al. *Thromb Haemost,* 79: 597-601 (1998)).

Finalmente, la especificidad y la falta de reactividad cruzada del anticuerpo A44V11 fueron confirmadas por Biacore. Basándose en la secuencia única pronosticada y la estructura 3D del epítopo para A44V11, los estudios de modelado molecular indican fuertemente que el A44V11 es específico para PAI-1 humano y de cyno.

Ejemplo 24: Mapeo de epítopos por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX MS)

Se aplicó el intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX) controlado por espectrometría de masas (MS) a los anticuerpos de unión a PAI-1 descritos en la presente memoria para caracterizar mejor los epítopos de cada anticuerpo. HDX MS es una técnica particularmente útil para comparar múltiples estados de la misma proteína. La metodología detallada y las aplicaciones de HDX MS a proteínas terapéuticas son descritas por Wei, et al., *Drug Discovery Today*, 19(1): 95-102 (2014). En pocas palabras, si un disolvente acuoso, todo-H_2O se reemplaza por un isótopo de hidrógeno que tiene propiedades espectroscópicas distintivas, se puede seguir este proceso de intercambio. Para la mayoría de los experimentos HDX modernos, se utiliza agua deuterada o "pesada" (D_2O). En particular, el hidrógeno unido al nitrógeno de la cadena principal (también referido como hidrógeno de la amida de la cadena principal) es útil para sondear la conformación de las proteínas. Véase, p. ej., Marcsisin, et al. *Anal Bioanal Chem.* 397(3): 967-972 (2010). Las regiones expuestas y dinámicas de las proteínas se intercambiarán de forma rápida, mientras que las regiones protegidas y rígidas de las proteínas intercambiarán más despacio. Todas las condiciones pertinentes (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.) se mantienen constantes, por lo que sólo la diferencia en la estructura (accesibilidad del disolvente, enlaces de hidrógeno) repercuten en este intercambio. La interacción del anticuerpo con PAI-1 bloqueará el marcaje de ciertas porciones del antígeno, produciendo de este modo una lectura diferente basada en el sitio de unión (epítopo).

Método experimental:

Se prepararon soluciones de partida PAI-1 de cyno (10 uM), PAI-1 de cyno unido a

A44v11 (10 µm cada uno) y PAI-1 de cyno unido a APGv2 (10 µm cada uno) en PBS, pH 7,2. Se dejó que las soluciones de proteína alcanzaran el equilibrio de unión mediante incubación durante 1 hora a la temperatura ambiente. Basándose en un valor de K_d de <50 pM, cada uno de los complejos de anticuerpo:antígeno se unió > 99% bajo las condiciones de marcaje descritas a continuación.

El intercambio de deuterio, la extinción, y la inyección de la muestra fueron manipulados por un sistema robótico automatizado (LEAP Tech., Carrboro, NC). Una alícuota de la solución de proteína se diluyó 10 veces con tampón de marcaje (PBS en D_2O al 99,9%, pD 7,2) y se dejó incubando a 20°C durante 10 s, 1 min, 5 min, o 4 horas. Al final del punto temporal de intercambio de deuterio, la reacción de marcaje se extinguió mediante la adición de 50 µL de la solución de marcaje a un volumen igual de fosfato de sodio 100 mM previamente enfriado (0°C), hidrocloruro de guanidina 4 M, TCEP 0,5 M, pH 2,5. Se prepararon controles no deuterados de una manera idéntica diluyendo 10 veces con PBS en H_2O.

Cada muestra extinguida (50 µL, 50 pmoles de cada proteína) se inyectó inmediatamente en un Waters nanoAcquity con Tecnología HDX (Waters Corp., Milford, MA). Se digirieron las proteínas en línea con una columna de pepsina Enzymate BEH de 2,1 mm x 30 mm (Waters Corp.), que se mantuvo a 20°C. Todos los elementos cromatográficos se mantuvieron a 0,0 ± 0,1°C dentro de la cámara de enfriamiento del sistema de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC). Los péptidos resultantes fueron atrapados y desalados durante 3 min a 100 µL/min y después se separaron en una columna ACQUITY UPLC HSS T3 de 1,0 x 100,0 mm (Waters Corp.) con un gradiente durante 12 min. de acetonitrilo/agua al 2-40% a 40 µL/min. Los niveles de deuterio no se corrigieron en la reversión del intercambio y se refirieron como relativos. Todos los experimentos de comparación se llevaron a cabo en condiciones idénticas, negando la necesidad de corrección de la reversión del intercambio. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El arrastre de péptidos entre inyecciones fue eliminado mediante la inyección de 50 µL de hidrocloruro de guanidina 1,5 M, ácido fórmico al 0,8%, y acetonitrilo al 4% en todas las columnas después de cada ronda.

Los espectros de masas se adquirieron con un aparato Waters Synapt G2- Si equipado con una fuente de electropulverización convencional (Waters Corp.) ejecutado en modo HDMSe. Los ajustes del aparato fueron los siguientes: la capilaridad fue de 3,5 kV, el cono de muestreo fue de 30 V, el equilibrado de la fuente fue de 30 V, la temperatura de la fuente fue de 80°C, la temperatura de desolvatación fue de 175°C, el gas del cono fue 50 L/h, el gas de desolvatación fue 600 L/h, y el gas nebulizador fue 6,5

bar. Los espectros de masas se adquirieron en un rango de m/z de 50-1.700. La exactitud de la masa se mantuvo a lo largo de cada ronda mediante infusión simultánea de 100 fmol/uL de [Glu1]-Fibrinopéptido B humano a través de la sonda LockMass.

La identificación MSE de los péptidos pépticos no deuterados se preformó utilizando el soporte lógico ProteinLynx Global Server (Waters Corp.). La absorción de deuterio para cada péptido se determinó utilizando el soporte lógico DynamX 2.0 (Waters Corp.). Los niveles de deuterio relativos se calcularon restando el centroide de la distribución isotópica para los péptidos no deuterados del correspondiente centroide del péptido marcado con deuterio. El soporte lógico generó automáticamente gráficos de absorción de deuterio.

Verificación de la absorción de deuterio para los estados de PAI-1

Después de la digestión con pepsina en línea, se identificaron 150 péptidos pépticos cyno-PAI-1 solapantes, dando como resultado una cobertura de la secuencia de 95,3% (véase la Figura 48). La absorción de deuterio se verificó (de 10 segundos a 4 horas) en los 150 péptidos para los tres estados diferentes de la proteína: (1) cyno-PAI-1 sola; (2) A44v11 unida a cyno-PAÏ-1; y (3) APGv2 unido a cyno-PAI-1.

La mayoría de los péptidos cyno-PAI-1 mostró una absorción de deuterio casi idéntica entre los tres estados, lo que indica que no hay interacción entre cyno-PAI-1 y ningún mAb en estas regiones. Véase la Figura 49(A), que representa una región de péptido representativa con este resultado (residuos 139-152). En contraste, los péptidos que incorporaban los residuos 44-64 mostraron una protección significativa frente al intercambio (reducción de la absorción de deuterio) cuando se unieron a cualquiera de A44v11 o APGv2 (Figura 49(B)). Además, los péptidos que incorporan los 295-322 también mostraron una protección significativa frente al intercambio cuando se unían a cualquiera de A44v11 o APGv2 (Figura 49(C)). Para esta región, la magnitud de protección fue mayor cuando cyno-PAI-1 se unía a A44v11 en lugar de APGv2 (Véase la Figura 49(C)). Esto indica que A44v11 puede proporcionar una mayor protección global frente al intercambio que APGv2 cuando se une a cyno-PAI-1.

Estudios de comparación:

Para los estudios de comparación, se verificó la absorción de deuterio para los 150 péptidos generados a partir de cada uno de los tres estados de cyno-PAI-1. (Véase, en general, Wei et al., *Drug Discovery Today,* 19(1): 95-102 (2014)). Se compararon los gráficos de datos de cada uno de los tres estados entre sí y se generó un gráfico de tipo

mariposa para facilitar la interpretación de los datos (véanse, p. ej., las Figuras 50(A), 51(A) y 52(A)). Para cada gráfico de tipo mariposa, el eje x es la posición del punto medio del péptido calculado, *i*, de cada uno de los 150 péptidos comparados; el eje de la *y* es el intercambio fraccionario relativo promedio (razón).

Asimismo se generaron gráficos de diferencia para cada comparación entre los estados cyno-PAI-1 (véanse, p. ej., las Figuras 50(B), 51(B), y 52(B)). En estos gráficos, la absorción de deuterio de un estado se resta del otro y se representa de manera similar a los gráficos de tipo mariposa. La suma de las diferencias para cada péptido está representada por una barra vertical. Las líneas de trazos horizontales representan los valores en los que cualquiera de las mediciones individuales (± 0,5 Da) o la suma de las diferencias (± 1,1 Da) exceden el error de la medición y pueden ser consideradas como diferencias reales entre los dos estados. Los detalles adicionales con respecto a esta técnica son descritos por Houde D. et al., *J. Pharm. Sci.* 100(6): 2071-86 (2011).

En primer lugar, se comparó cyno-PAI-1 solo con el estado unido A44v11:cyno-PAI-1 (Figura 50). El gráfico de tipo mariposa para esta comparación se muestra en la Figura 50(A). El gráfico de diferencias para esta comparación se muestra en la Figura 50(B). Las diferencias observadas entre cyno-PAI-1 unido a A44v11 y la forma libre cyno-PAI-1 se encuentran principalmente en dos regiones de cyno-PAI-1 Una región está cerca del extremo N (residuos 44-64) y la otra región está cerca del extremo C (residuos 307-321) (véase la Figura 50(B)).

A continuación, se comparó cyno-PAI-1 solo con el estado unido APGv2: cyno-PAI-1 (Figura 51). El gráfico de tipo mariposa para esta comparación se muestra en la Figura 51(A). El gráfico de diferencias para esta comparación se muestra en la Figura 51(B). Las diferencias observadas entre cyno-PAI-1 unido a APGv2 y la forma libre cyno-PAI-1 se encuentran principalmente en dos regiones de cyno-PAI-1. Una región está cerca del extremo N y la otra cerca del extremo C, que es similar al resultado de A44v11:cyno-PAI-1. Los complejos de A44v11 y APGv2 con cyno-PAI-1 comparten péptidos que muestran una reducción de la absorción de deuterio cuando en el estado unido, lo que puede indicar que los epítopos para los dos anticuerpos son similares.

Por último, se compararon entre sí los dos estados de cyno-PAI-1 unidos al anticuerpo (Figura 52). El gráfico de tipo mariposa para esta comparación se muestra en la Figura 52(A). El gráfico de diferencias para esta comparación se muestra en la Figura 52(B). La diferencia observada entre A44v11:cyno-PAI-1 y APGv2:cyno-PAI-1 se encuentra en la región C-terminal de cyno-PAI-1. (Véase la Figura 52 (B)).

Ejemplo 25: Comparación de epítopos de los anticuerpos A44v11 y APGv2

Se utilizó HDX MS para definir mejor los epítopos de los anticuerpos A44v11 y APGv2. Mediante el uso de los péptidos solapantes generados en HDX MS, se puede perfeccionar un epítopo de anticuerpo un poco mejor que la resolución a nivel de péptido (por ejemplo, véase la Figura 48). Los datos HDX MS para los péptidos que mostraron una protección significativa frente al intercambio con la unión a A44V11 se analizaron además para determinar el epítopo para la interacción cyno-PAI-1:A44v11. Se encontró que los datos HDX para el epítopo para A44V11 de cyno-PAI-1 eran compatibles con el epítopo determinado utilizando el enfoque de la cristalografía. El epítopo para A44V11 cyno-PAI-1 identificado utilizando HDX MS aparece en la Figura 53 (negrita) y más abajo en formato abreviado:

T-T-G-G-E-T-R-Q-Q-I-Q (SEQ ID NO: 159);

R-H-L (SEQ ID NO: 160);

T-D-M-X-X-X-F-Q-A-D-F-T-S-L-S-N-Q-E-P-L-H-V (SEQ ID NO: 161)

Los datos de HDX MS para los péptidos cyno-PAI-1 que mostraron una protección significativa frente al intercambio con la unión a APGv2 se analizaron para determinar aún más el epítopo para la interacción cyno-PAI-1:APGv2. Los datos de mapeo de epítopos por HDX MS para A44v11 y APGv2 demuestran que los epítopos están en la misma región, como se observa en general en la Figura 52. En la región de los residuos 307-321 los mismos péptidos muestran protección en el estado unido a anticuerpo tanto para A44v11 como para APGv2. Sin embargo, la magnitud de la protección es mayor cuando cyno-PAI-1 está unido a A44v11 en lugar de APGv2 (véase la figura 49(C)). Este hallazgo es más evidente en la Figura 52(B), que representa a los picos de diferencia en la región de los residuos 307-321 cyno-Pal-1. Esto indica que hay diferencias en los contactos específicos realizados entre cyno-PAI-1 y cada uno de los anticuerpos A44V11 y APGv2. Por lo tanto, parece que mientras que los epítopos tanto para A44V11 como para APGv2 se encuentran en una región similar de PAI-1, los epítopos para cada anticuerpo no son los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende:

(a) una región marco de cadena pesada y una región variable de cadena pesada, comprendiendo la región variable de cadena pesada una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y

(b) una región marco de cadena ligera y una región variable de cadena ligera, comprendiendo la región variable de cadena ligera una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEC ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

2. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 que comprende:

(a) una región marco de cadena pesada y una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, y

(b) una región marco de cadena ligera y una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93.

3. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1 que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que es idéntica en al menos 95% a la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la reivindicación 2, y/o

(b) una región variable de cadena ligera que es idéntica en al menos 95% a la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la reivindicación 2.

4. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une esencialmente al mismo epítopo que el anticuerpo de la reivindicación 1.

5. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende:

(a) una región marco de cadena pesada y una región variable de cadena pesada, comprendiendo la región variable de cadena pesada una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 32; y

(b) una región marco de cadena ligera y una región variable de cadena ligera, comprendiendo la región variable de cadena ligera una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 36, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 35.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región variable de cadena pesada comprende el SEQ ID NO: 6, y la región variable de cadena ligera comprende el SEQ ID NO: 7.

7. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une esencialmente al mismo epítopo que el anticuerpo de la reivindicación 5.

8. Un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a PAI-1 humano, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 82, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(b) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 83, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 92, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(c) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 84, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(d) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(e) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(f) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que

comprende el SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 94, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(g) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 87, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma:

(h) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 88, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 96, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(i) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 97, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(j) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 90, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 98, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(l) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma;

(m) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; o

(n) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma.

9. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 22, una región CDR2 de cadena pesada

que comprende el SEQ ID NO: 21, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 20; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 24, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 23,

(b) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 28, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 27, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 26; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 31, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 30, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 29,

(c) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 40, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 39, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 38; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 43, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 42, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 41,

(d) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 46, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 45, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 44; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 48, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 47,

(e) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 51, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 50; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 55, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 54, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 53,

(f) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 58, una región CDR2 de cadena pesada

que comprende el SEQ ID NO: 57, y la región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 56; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 61, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 60, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 59,

(g) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 64, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 63, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 62; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 67, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 66, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 65,

(h) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 70, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 69, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 68; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 73, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 72, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 71; o

(i) una región variable de cadena pesada que comprende una región CDR1 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 76, una región CDR2 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 75, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 74; y una región variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 79, una región CDR2 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 78, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 77.

10. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que se une esencialmente al mismo epítopo en PAI-1 que el anticuerpo monoclonal humanizado de la reivindicación 8 o la reivindicación 9.

11. Un método para restaurar la generación de plasmina que comprende la administración a un sujeto que lo necesite por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el método trata una afección que comprende aumento de niveles de tejido fibrótico.

13. El método de la reivindicación 12, en donde la afección es la fibrosis, fibrosis cutánea, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar crónica, fibrosis hepática, fibrosis renal, enfermedad renal crónica, trombosis, trombosis venosa y arterial, trombosis venosa profunda, isquemia de la extremidad periférica, trombosis por coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis, o reestenosis del dispositivo intraluminal.

14. El método de la reivindicación 11, 12, o 13 en donde el anticuerpo PAI-1 comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

15. El uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAl-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por el aumento de los niveles de PAI-1 o el aumento de la sensibilidad a PAI-1, que comprende la administración a un paciente por vía oral, por vía parenteral mediante una solución para inyección, mediante inhalación, o por vía tópica.

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

DEGIULIO, James V.
McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP
300 South Wacker Drive, Suite 3100
Chicago, IL 60606
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
02 February 2016 (02.02.2016)

Applicant's or agent's file reference
13-596-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2014/050896

International filing date *(day/month/year)*
13 August 2014 (13.08.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address

1 - PRITSKER, Alla
2 - GRAILHE, Patrick
3 - RAK, Alexey
4 - MATHIEU, Magali
5 - MORGAN, Christopher Ryan
6 - BAURIN, Nicolas

State of Nationality | State of Residence

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

see box 3

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The persons in box 1 are now recorded as Inventors only.

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

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Claveri Sebastien
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

DEGIULIO, James V.
McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP
300 South Wacker Drive, Suite 3100
Chicago, IL 60606
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
02 February 2016 (02.02.2016)

Applicant's or agent's file reference
13-596-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2014/050896

International filing date *(day/month/year)*
13 August 2014 (13.08.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address

1 - POIRER, Bruno
2 - DAVEU, Cyril
3 - DUFFIEUX, Francis
4 - LI, Han
5 - KOMINOS, Dorothea
6 - JANIAK, Philip

State of Nationality | State of Residence

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

see box 3

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The persons in box 1 are now recorded as Inventors only.

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

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Claveri Sebastien
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

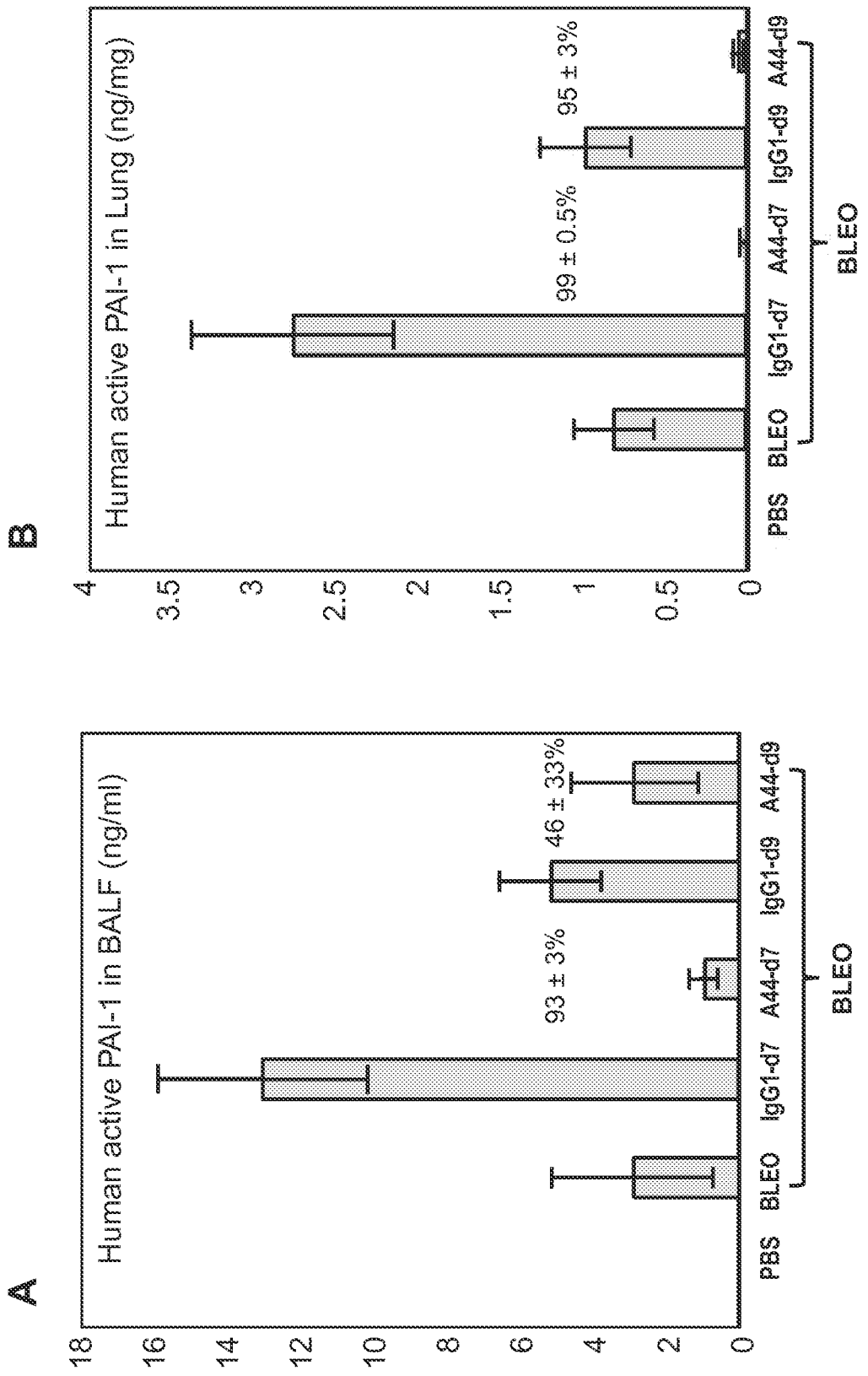

A
Human active PAI-1 in BALF (ng/ml)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
93 ± 3%
46 ± 33%
PBS
BLEO
IgG1-d7
A44-d7
IgG1-d9
A44-d9
BLEO
B
Human active PAI-1 in Lung (ng/mg)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
99 ± 0.5%
95 ± 3%
PBS
BLEO
IgG1-d7
A44-d7
IgG1-d9
A44-d9
BLEO

FIG. 28

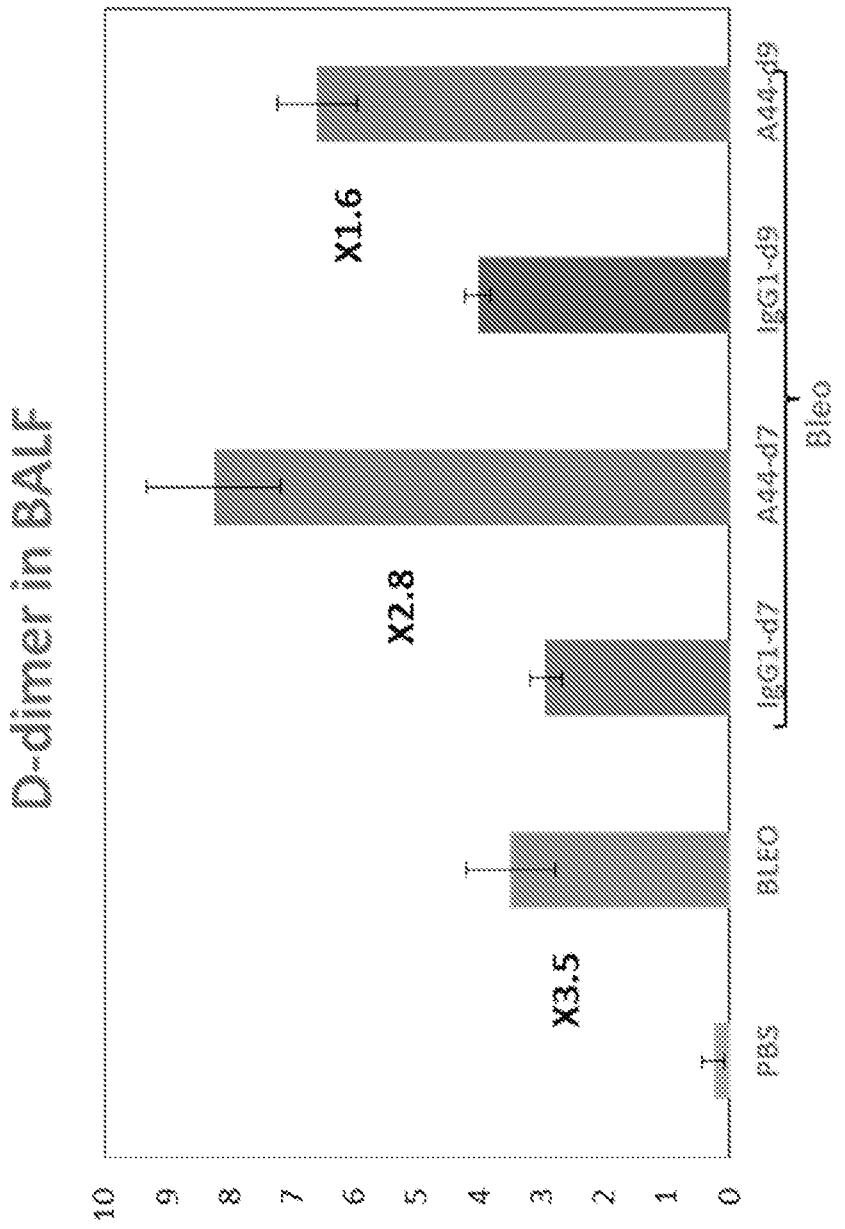

D-dimer in BALF
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
PBS
BLEO
IgG1-47
A44-47
IgG1-49
A44-49
Bleo
X3.5
X2.8
X1.6

FIG. 29

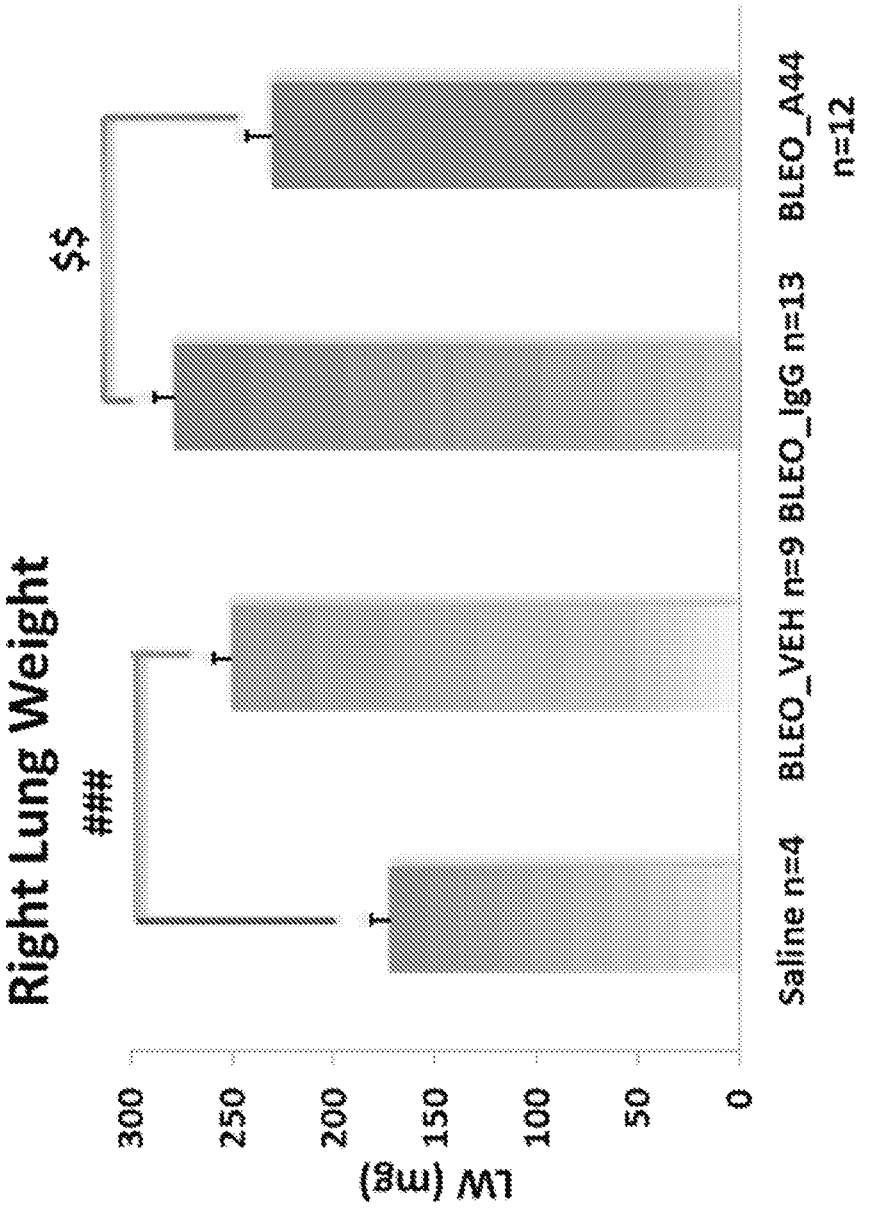

Right Lung Weight
###
$$
LW (mg)
300
250
200
150
100
50
0
Saline n=4
BLEO_VEH n=9
BLEO_IgG n=13
BLEO_A44 n=12
One way ANOVA followed by a Newman-Keuls test
: p<0.001 vs PBS
$$: p<0.01 vs BLEO_IgG1

FIG. 30

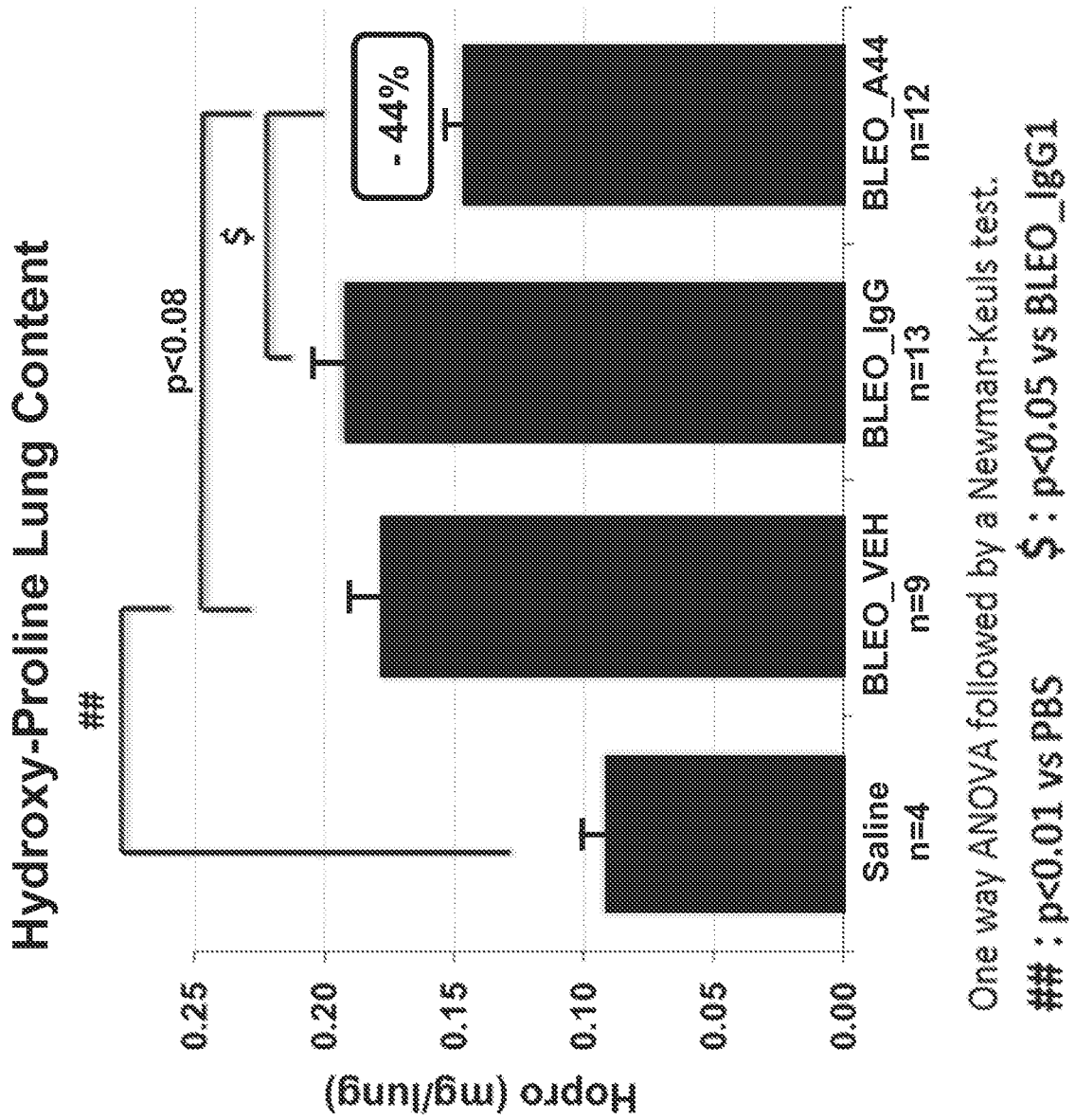

Hydroxy-Proline Lung Content
##
p<0.08
$
- 44%
Hopro (mg/lung)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Saline n=4
BLEO_VEH n=9
BLEO_IgG n=13
BLEO_A44 n=12
One way ANOVA followed by a Newman-Keuls test.
: p<0.01 vs PBS
$: p<0.05 vs BLEO_IgG1

FIG. 31

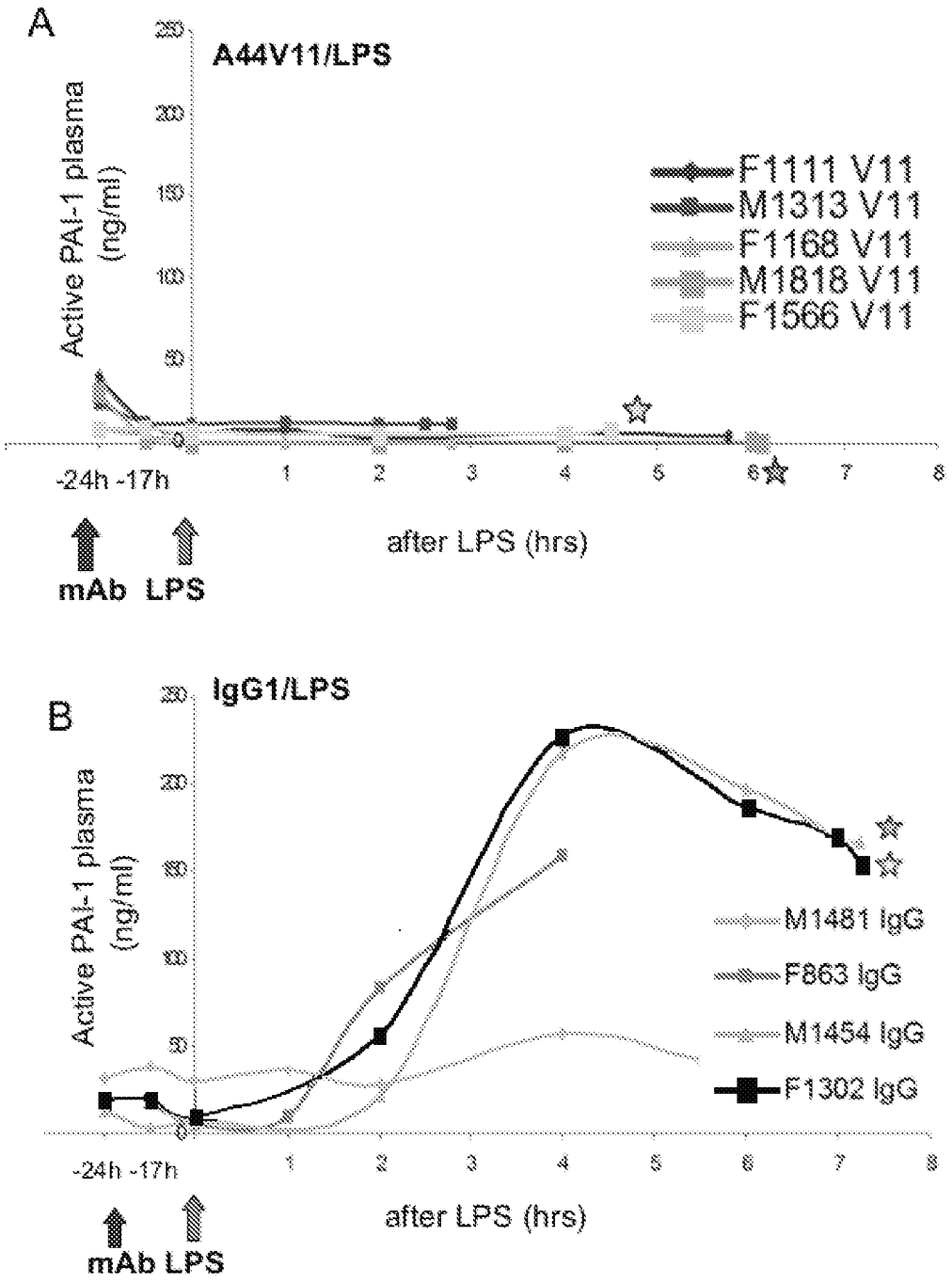

A
A44V11/LPS
Active PAI-1 plasma (ng/ml)
F1111 V11
M1313 V11
F1168 V11
M1818 V11
F1566 V11
-24h -17h
after LPS (hrs)
mAb
LPS
B
IgG1/LPS
Active PAI-1 plasma (ng/ml)
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG
-24h -17h
after LPS (hrs)
mAb
LPS

FIG. 32

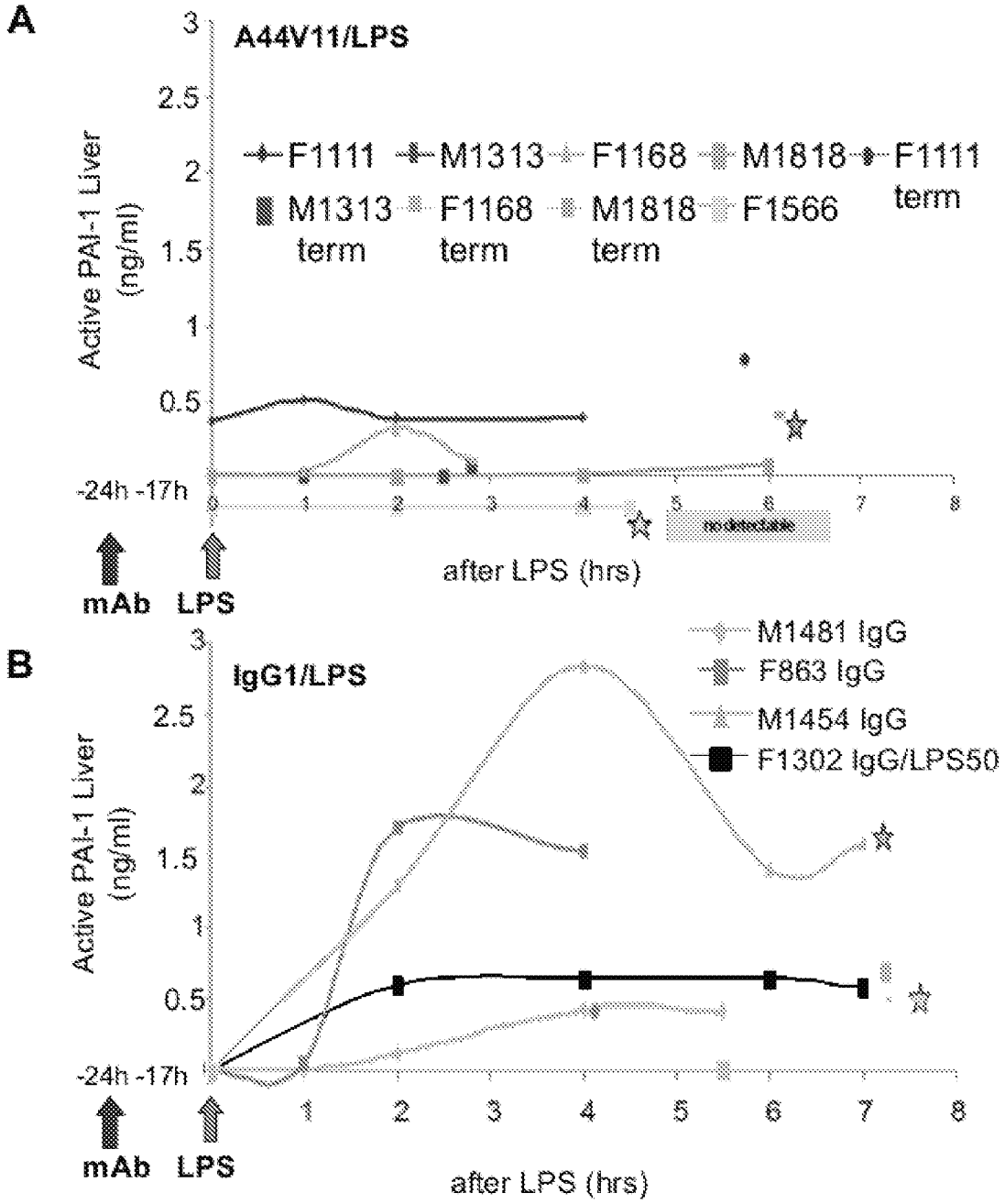

A
A44V11/LPS
Active PAI-1 Liver (ng/ml)
F1111
M1313
F1168
M1818
F1111 term
M1313 term
F1168 term
M1818 term
F1566
-24h -17h
mAb
LPS
after LPS (hrs)
B
IgG1/LPS
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG/LPS50
Active PAI-1 Liver (ng/ml)
-24h -17h
mAb
LPS
after LPS (hrs)

FIG. 33

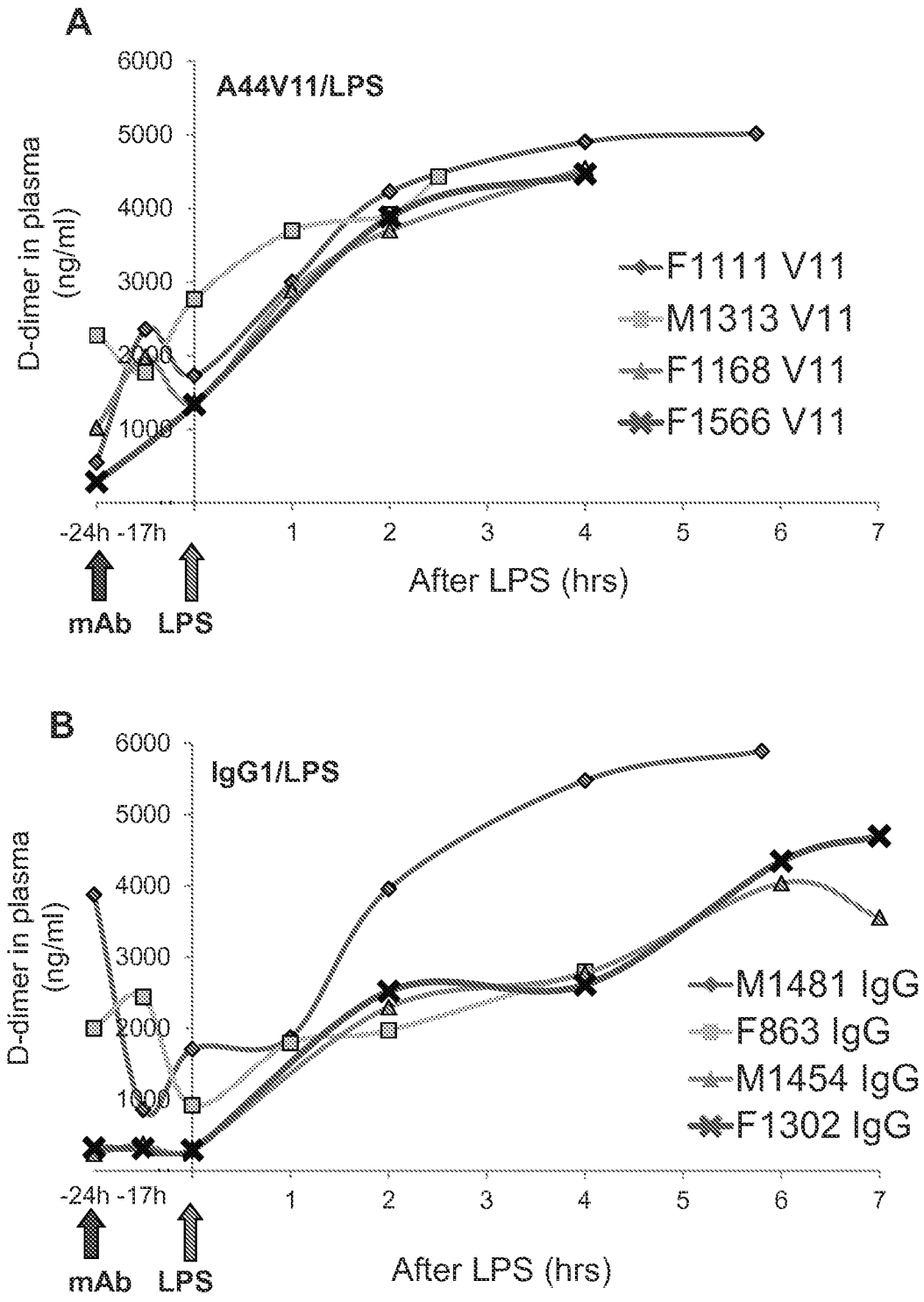

A
A44V11/LPS
D-dimer in plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
F1111 V11
M1313 V11
F1168 V11
F1566 V11
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
After LPS (hrs)
mAb
LPS
B
IgG1/LPS
D-dimer in plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
After LPS (hrs)
mAb
LPS

FIG. 34

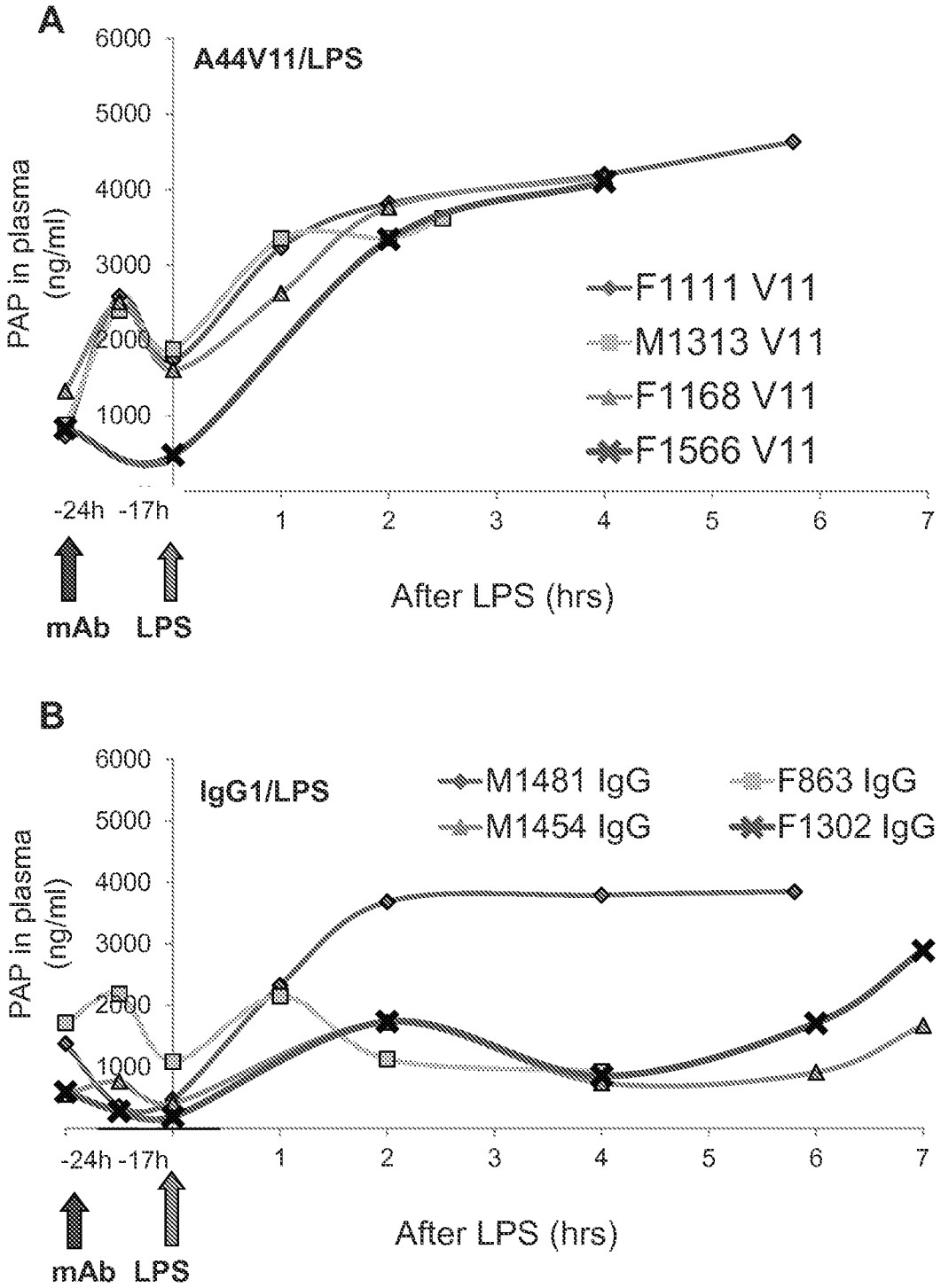

A
A44V11/LPS
PAP in plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
F1111 V11
M1313 V11
F1168 V11
F1566 V11
-24h -17h
1 2 3 4 5 6 7
After LPS (hrs)
mAb LPS
B
IgG1/LPS
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG
PAP in plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
-24h -17h
1 2 3 4 5 6 7
After LPS (hrs)
mAb LPS

FIG. 35

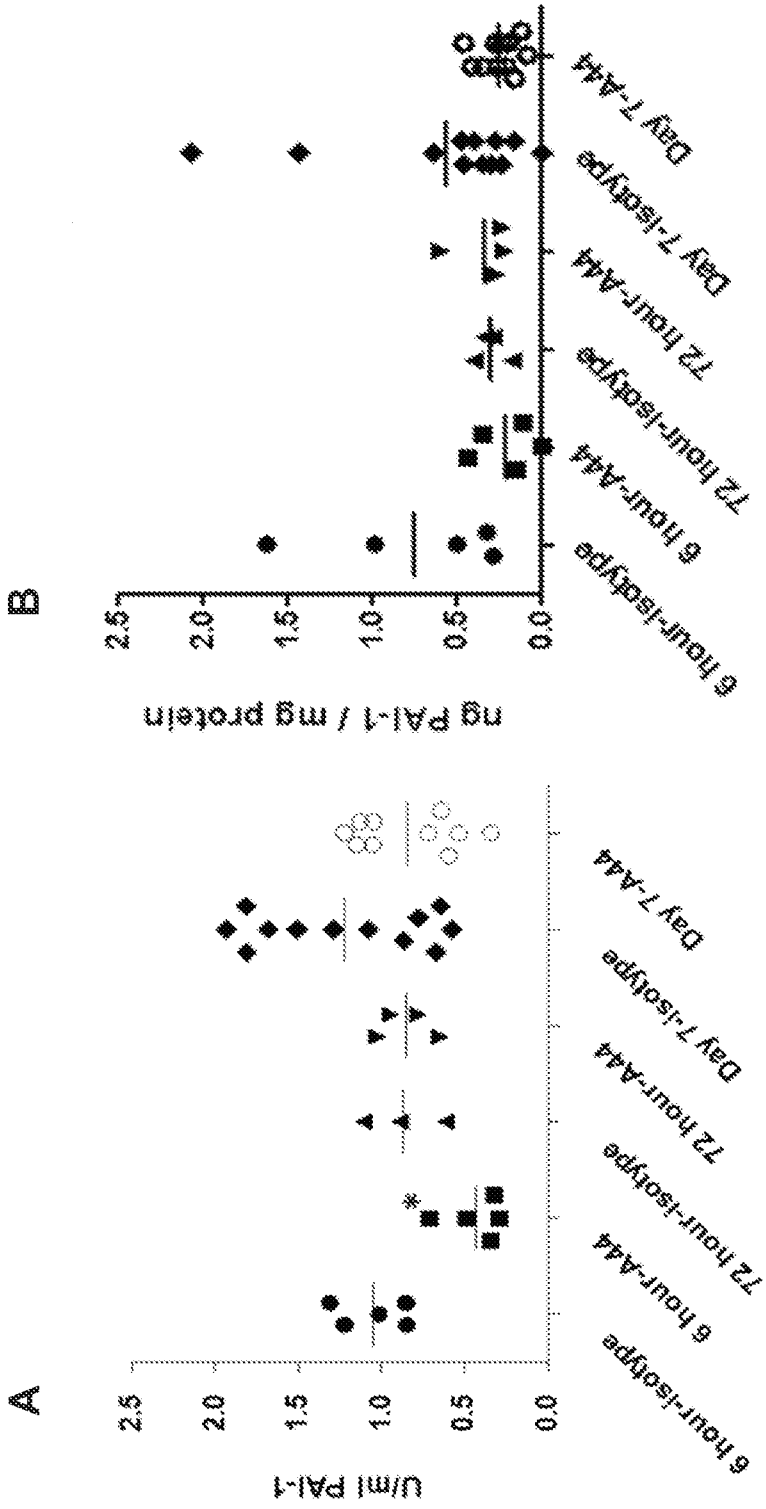

A
U/ml PAI-1
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6 hour-Isotype
6 hour-AAA
72 hour-Isotype
72 hour-AAA
Day 7-Isotype
Day 7-AAA
B
ng PAI-1 / mg protein
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6 hour-Isotype
6 hour-AAA
72 hour-Isotype
72 hour-AAA
Day 7-Isotype
Day 7-AAA

FIG. 36

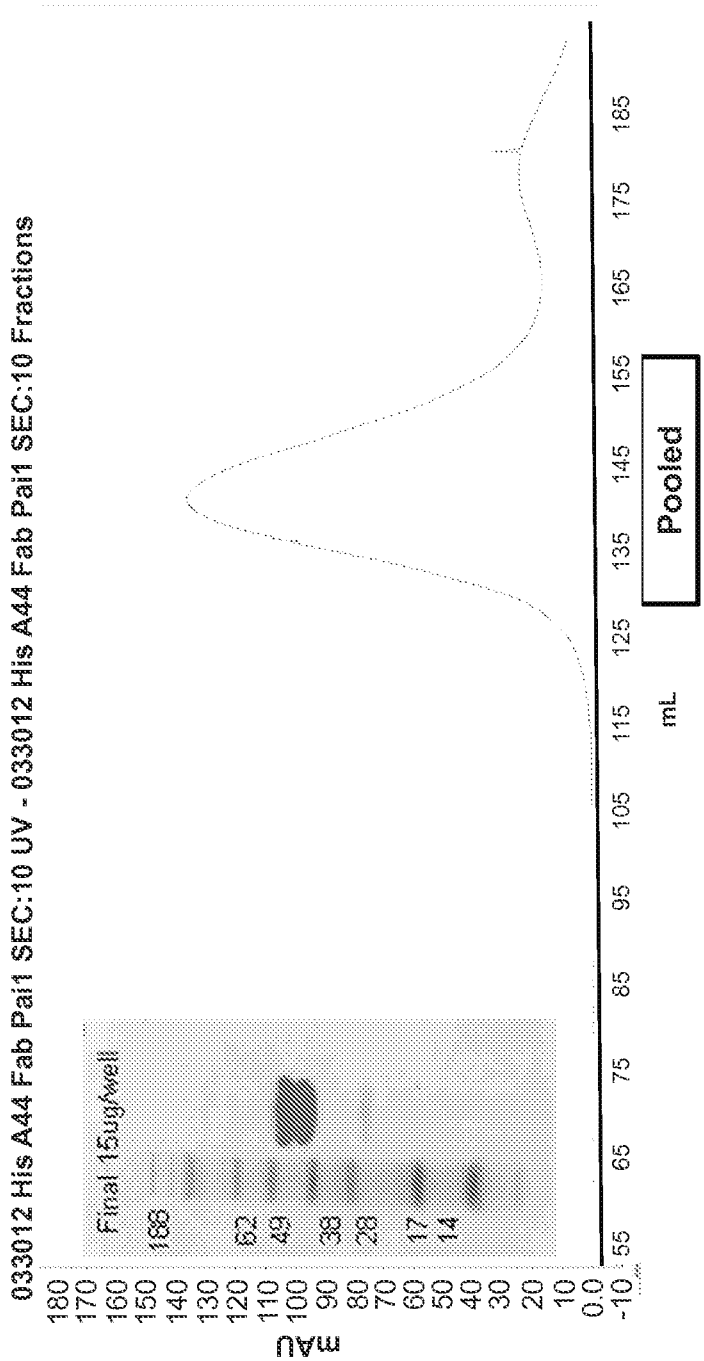

033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10 UV - 033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10 Fractions
mAU
mL
Pooled
Final 15ug/well
183
62
49
38
28
17
14

FIG. 37

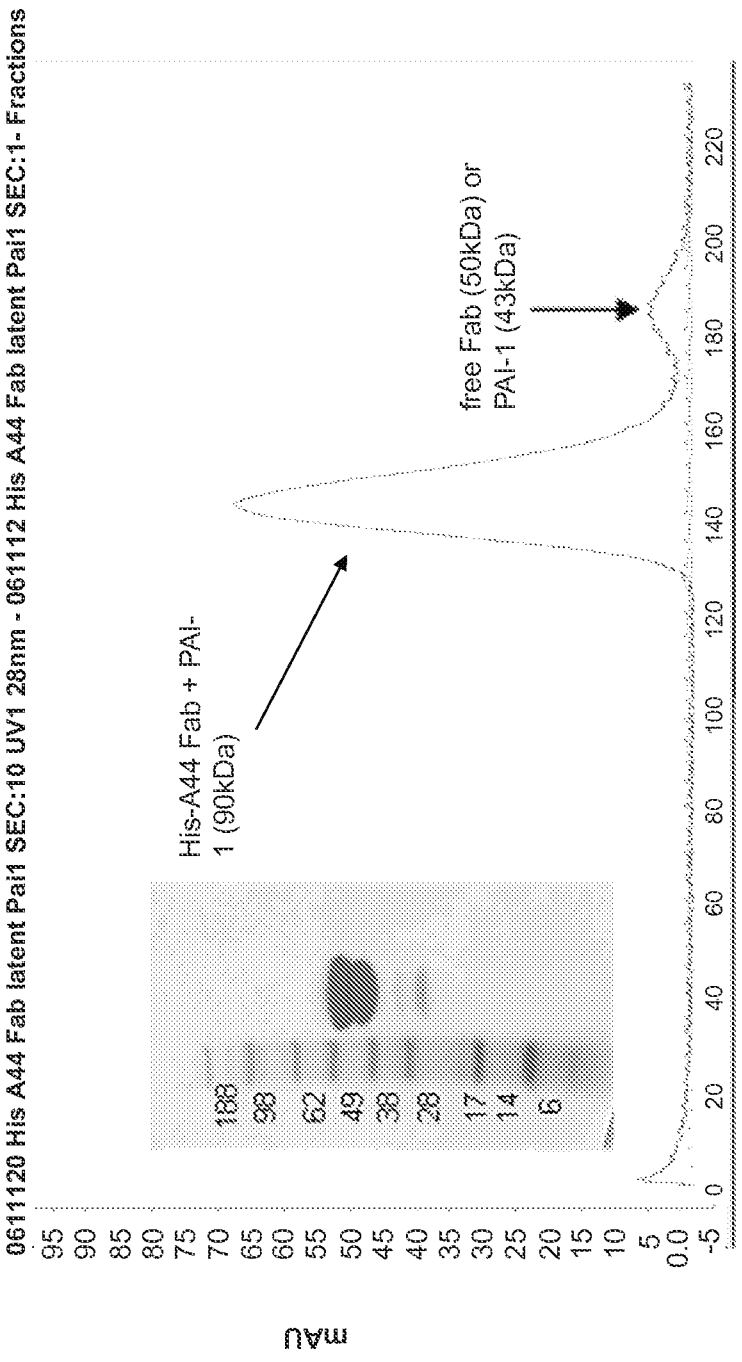

0611120 His A44 Fab latent Pai1 SEC:10 UV1 28nm - 061112 His A44 Fab latent Pai1 SEC:1- Fractions
mAU
mL
His-A44 Fab + PAI-1 (90kDa)
free Fab (50kDa) or PAI-1 (43kDa)
188
98
62
49
38
28
17
14
6

FIG. 38

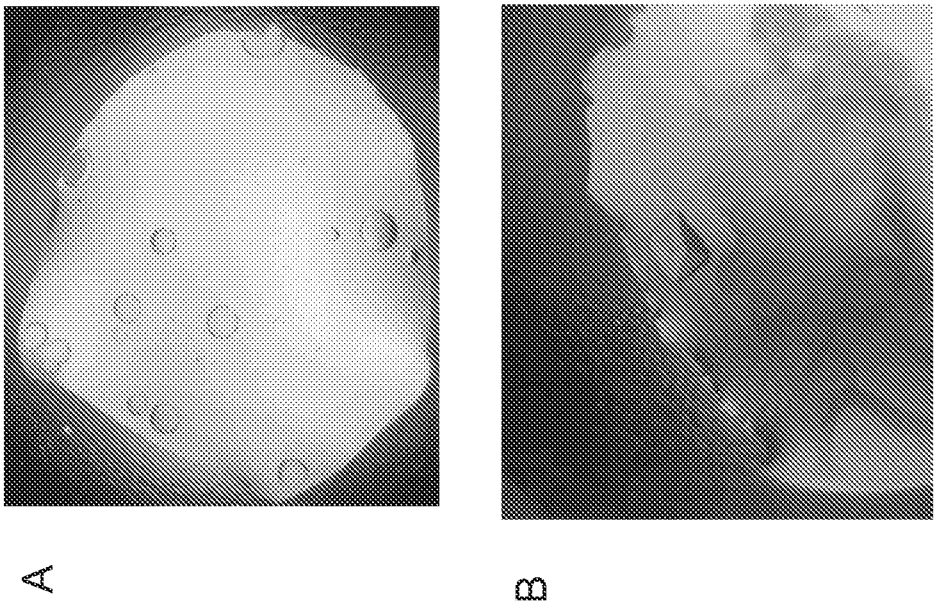


FIG. 39

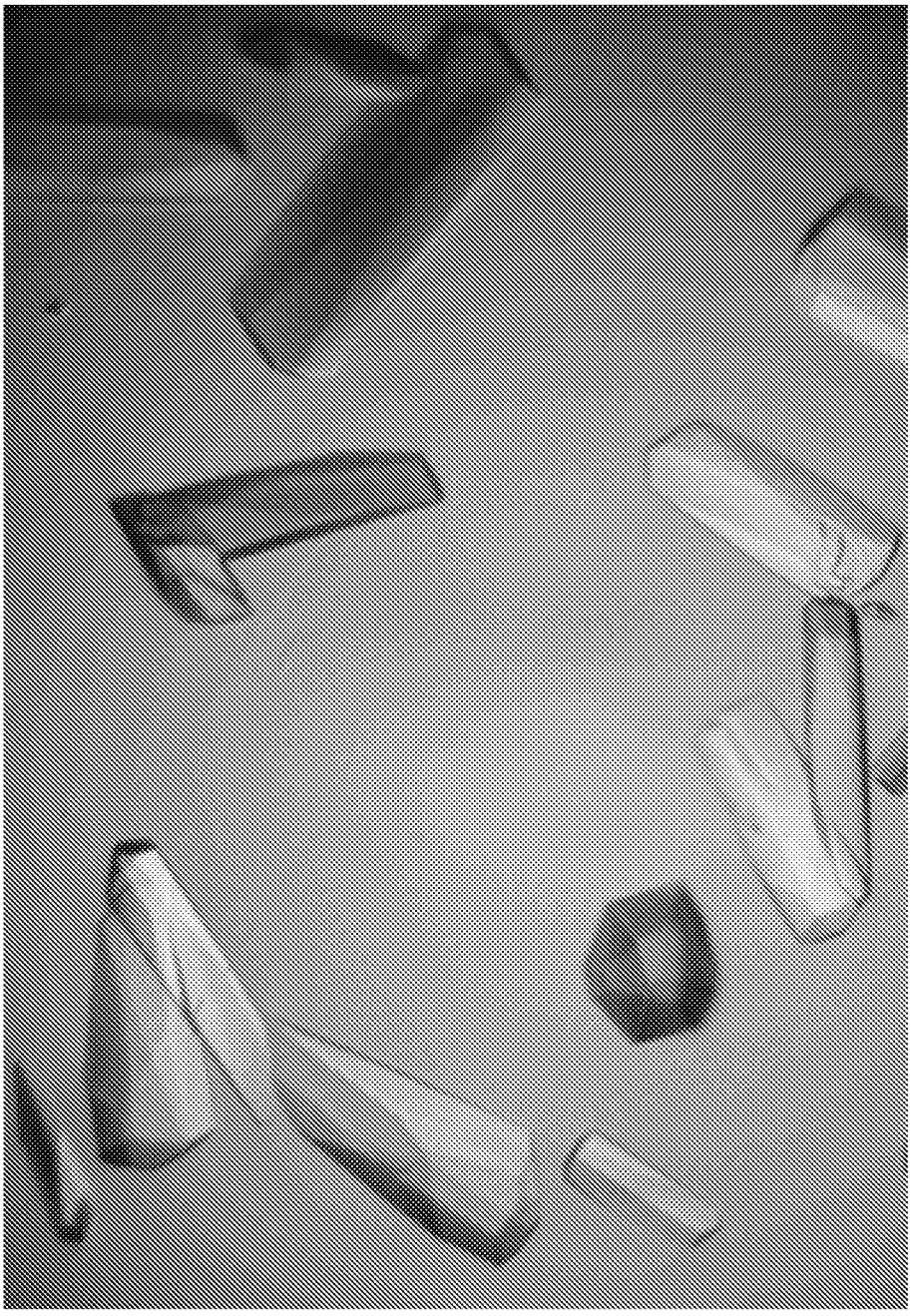


FIG. 40

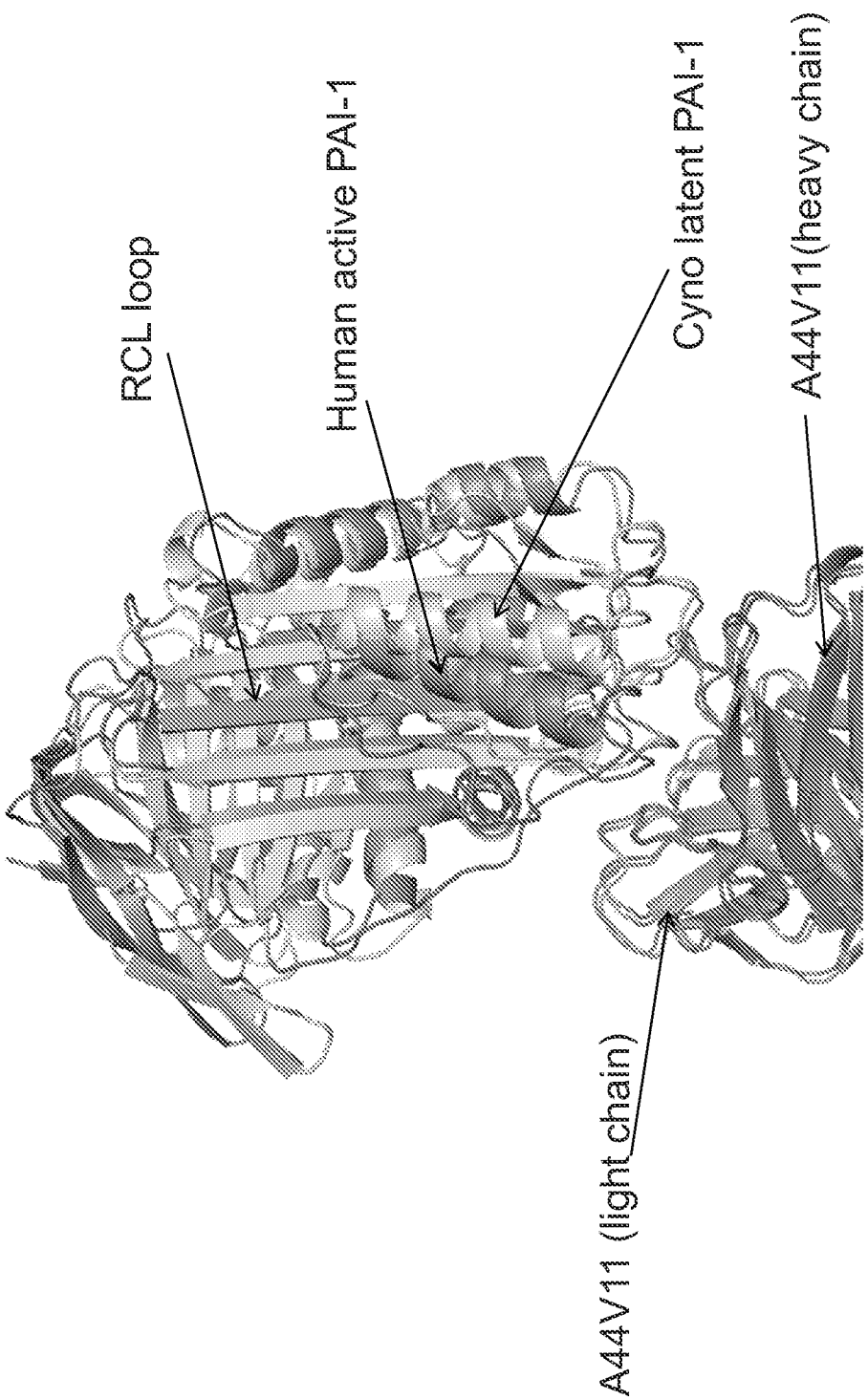

RCL loop
Human active PAI-1
Cyno latent PAI-1
A44V11(heavy chain)
A44V11 (light chain)

FIG. 41

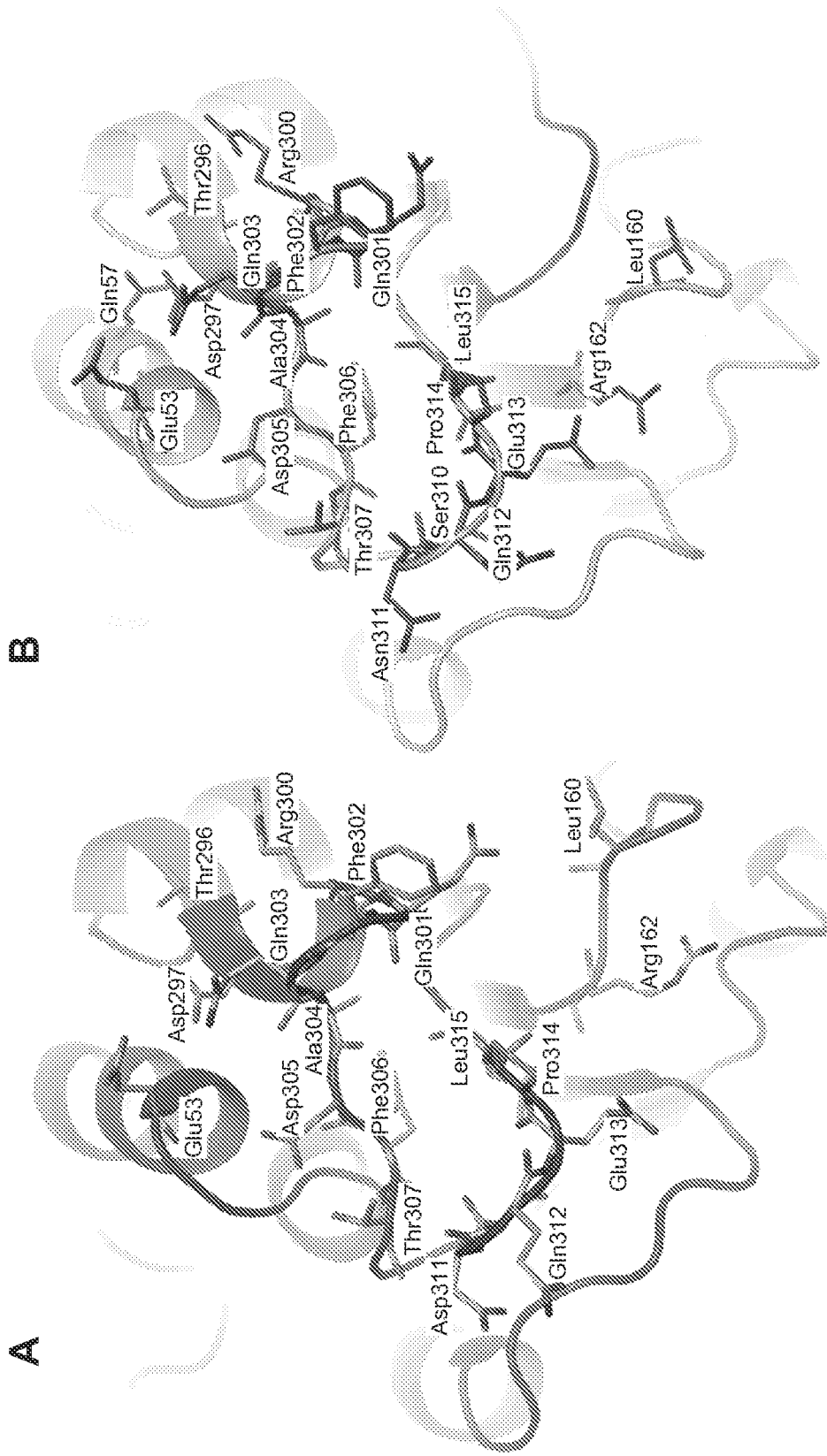

A
Active Human PAI1
Glu53
Asp297
Thr296
Arg300
Gln303
Phe302
Gln301
Asp305
Ala304
Phe306
Leu315
Pro314
Leu160
Arg162
Thr307
Glu313
Asp311
Gln312
B
Latent Cyno PAI1
Gln57
Glu53
Asp297
Thr296
Arg300
Gln303
Phe302
Gln301
Asp305
Ala304
Phe306
Leu315
Pro314
Leu160
Arg162
Thr307
Ser310
Glu313
Asn311
Gln312

FIG. 42

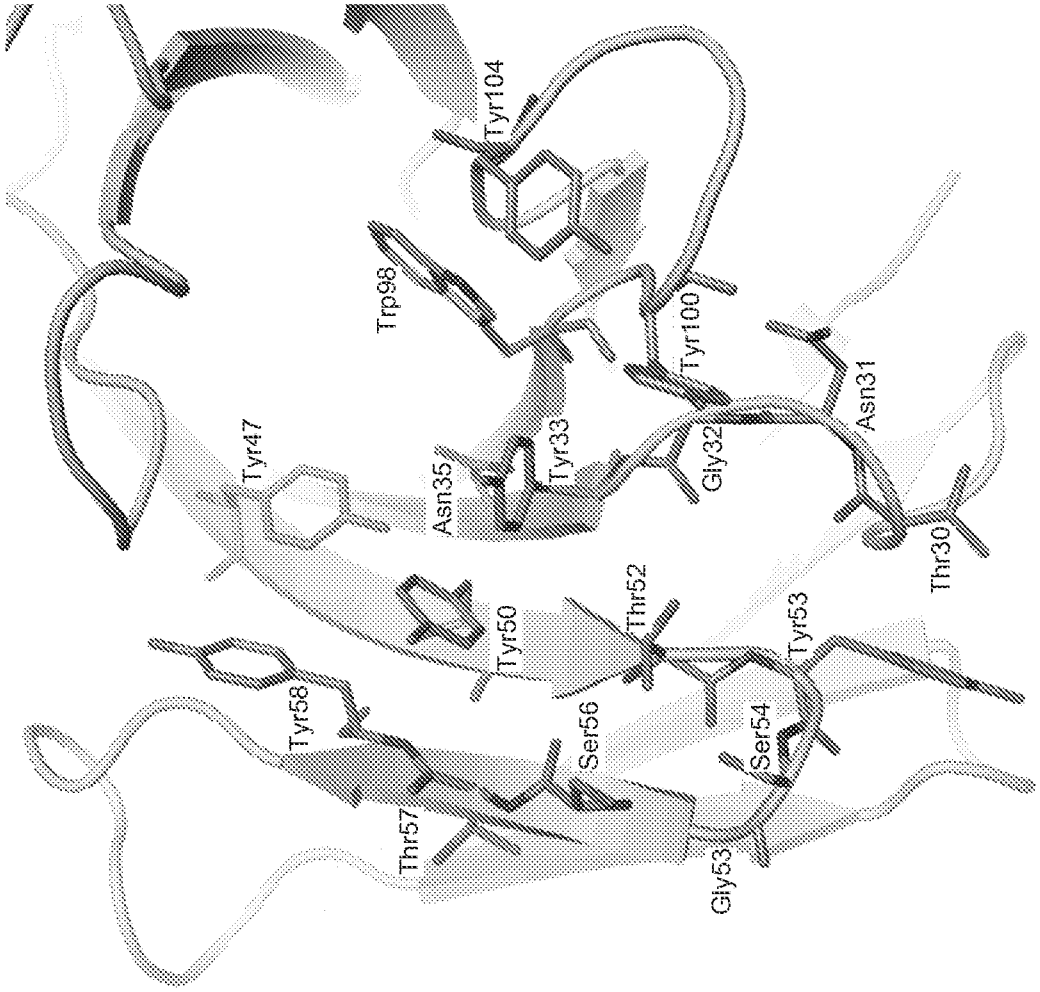

Tyr104
Trp98
Tyr100
Asn31
Tyr47
Asn35
Tyr33
Gly32
Thr30
Thr52
Tyr50
Tyr53
Tyr58
Ser56
Ser54
Thr57
Gly53

FIG. 43

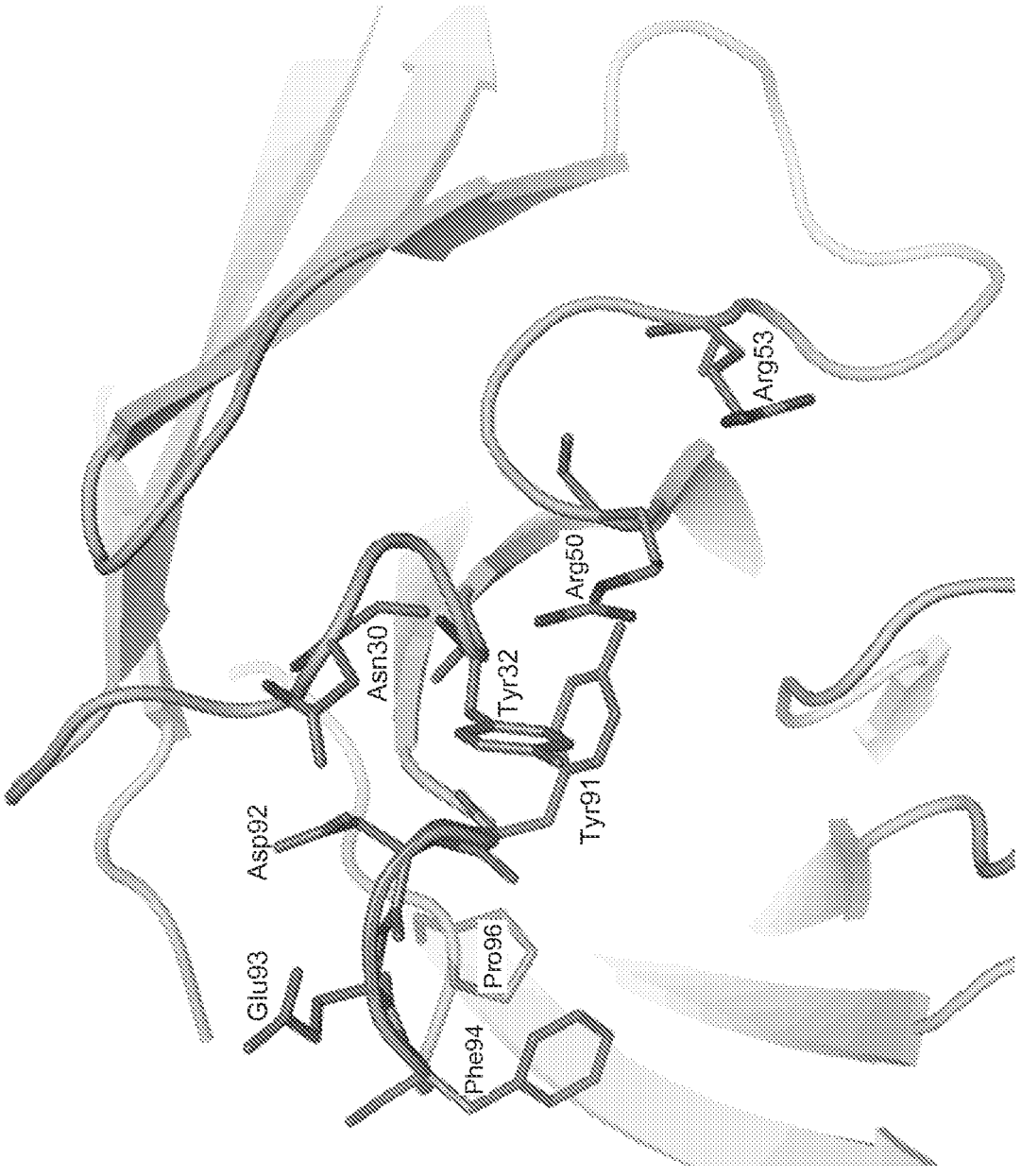


FIG. 44

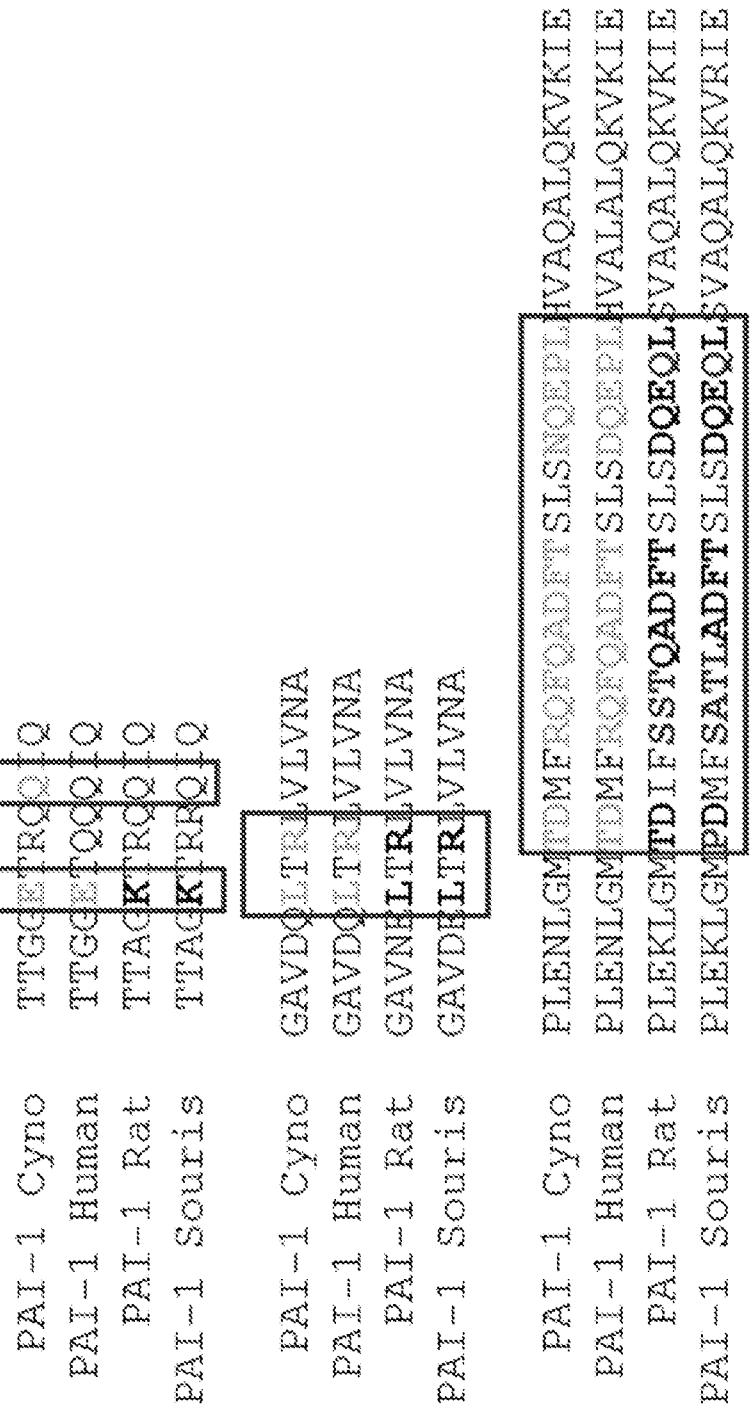

PAI-1 Cyno TTGQETRQQTQ
PAI-1 Human TTGQETQQQTQ
PAI-1 Rat TTAQKTRQQTQ
PAI-1 Souris TTAQKTRQQTQ
PAI-1 Cyno GAVDQLTRLVLVNA
PAI-1 Human GAVDQLTRLVLVNA
PAI-1 Rat GAVNHLTRLVLVNA
PAI-1 Souris GAVDHLTRLVLVNA
PAI-1 Cyno PLENLGMTDMFRQFQADFTSLSNQEPLHVAQALQKVKIE
PAI-1 Human PLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQEPLHVALALQKVKIE
PAI-1 Rat PLEKLGMTDIFSSTQADFTSLSDQEQLSVAQALQKVKIE
PAI-1 Souris PLEKLGMPDMFSATLADFTSLSDQEQLSVAQALQKVRIE

FIG. 45

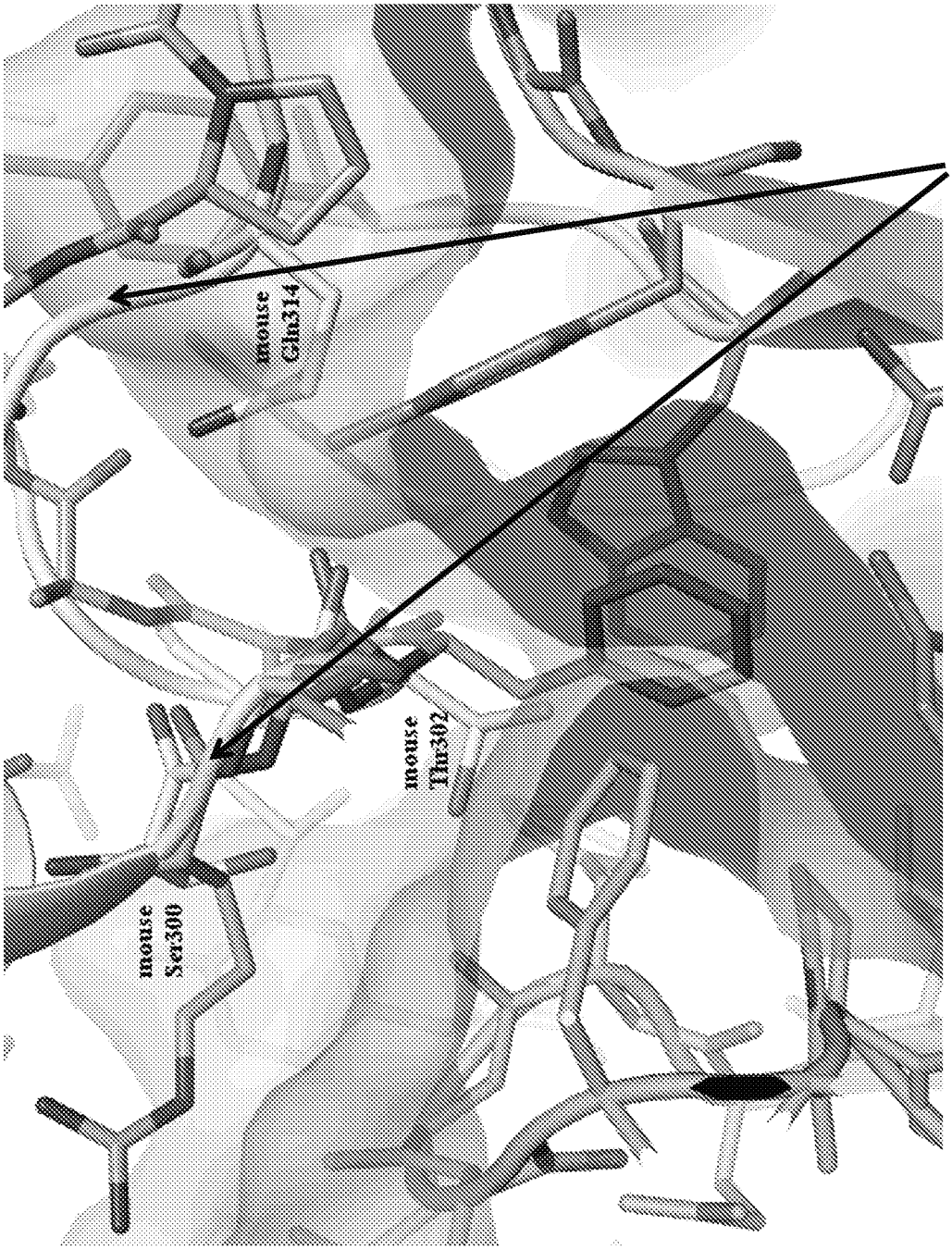


FIG. 46

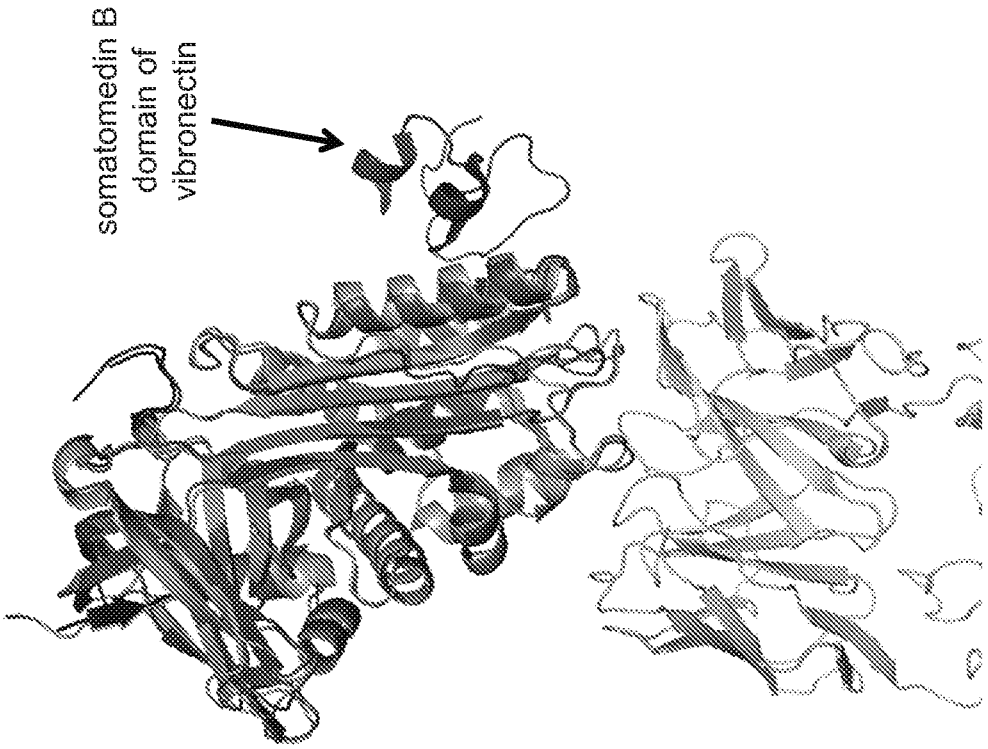


FIG. 47

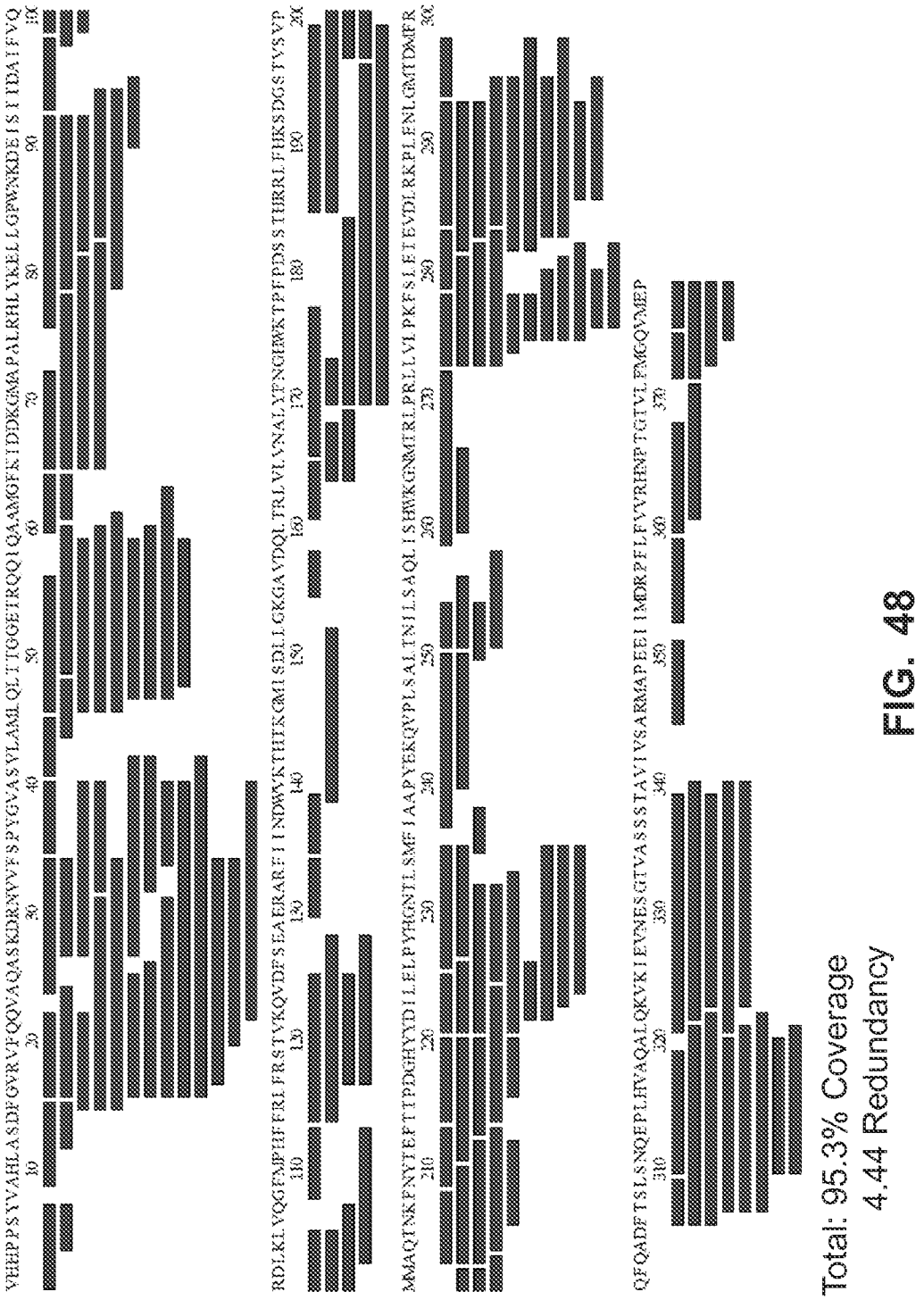


FIG. 48

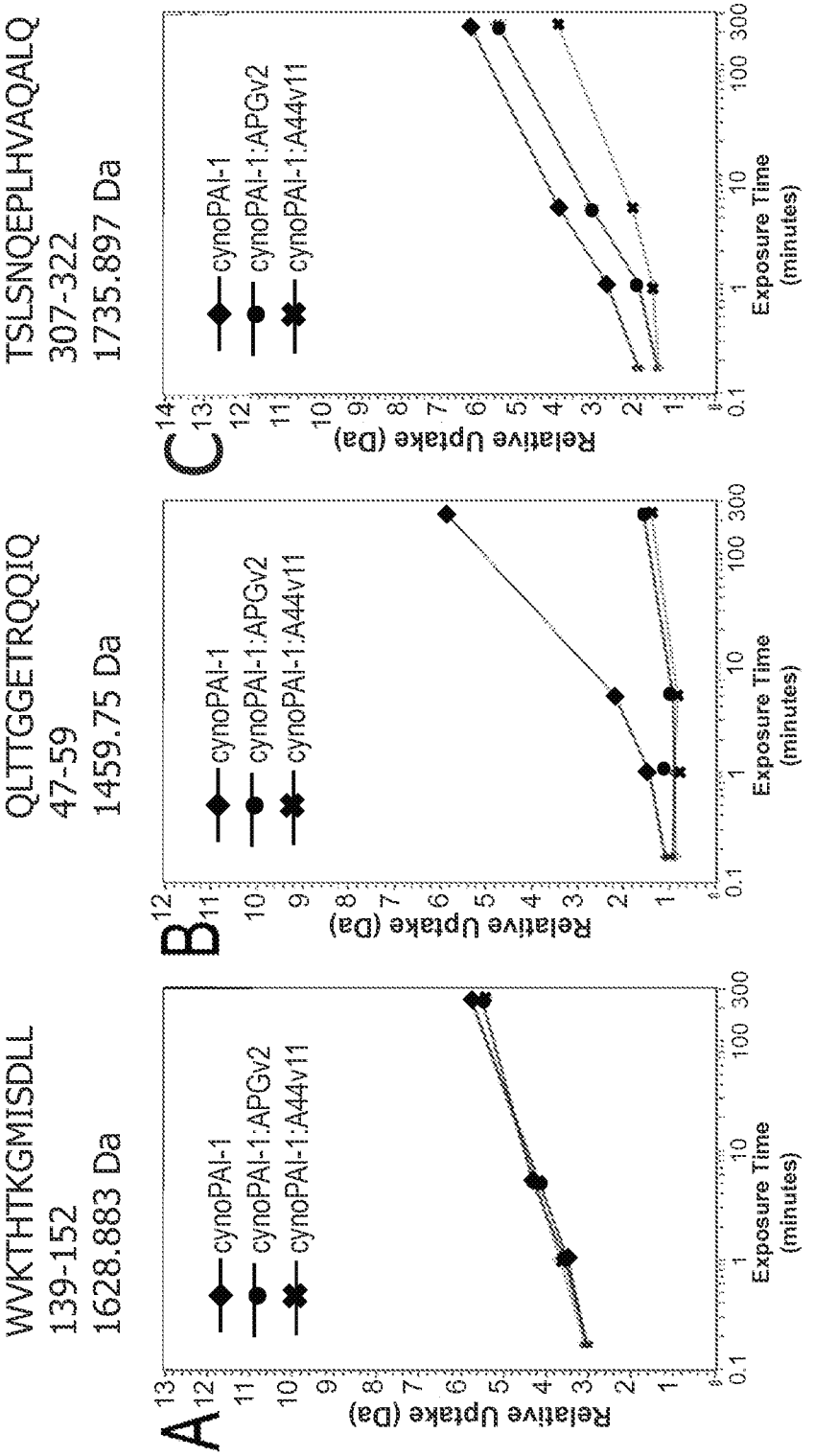

WVKTHTKGMISDLL
139-152
1628.883 Da
QLTTGGETRQQIQ
47-59
1459.75 Da
TSLSNQEPLHVAQALQ
307-322
1735.897 Da
A
B
C
cynoPAI-1
cynoPAI-1:APGv2
cynoPAI-1:A44v11
Relative Uptake (Da)
Exposure Time (minutes)

FIG. 49

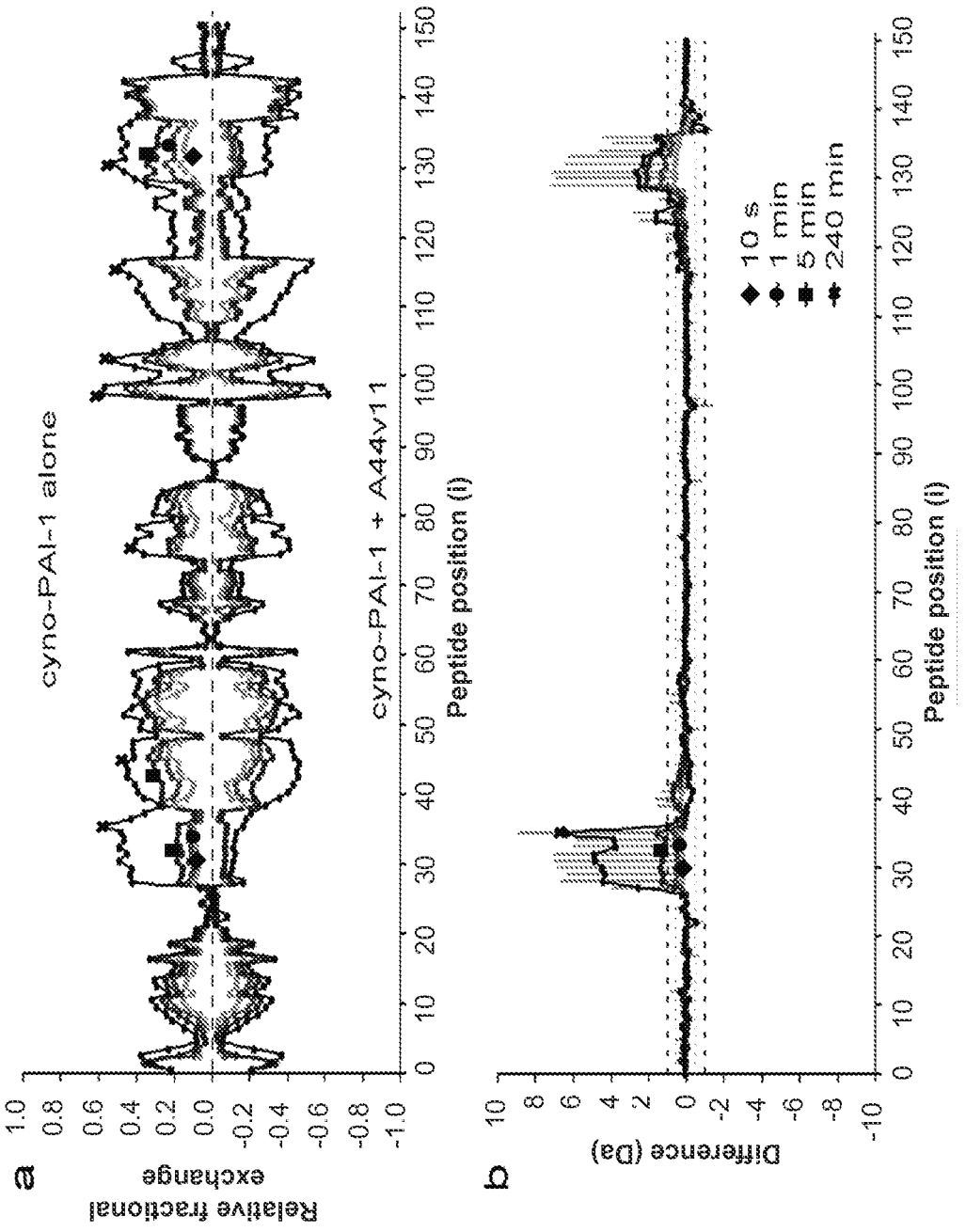

a
cyno-PAI-1 alone
cyno-PAI-1 + A44v11
Relative fractional exchange
Peptide position (i)
b
Difference (Da)
Peptide position (i)
10 s
1 min
5 min
240 min

FIG. 50

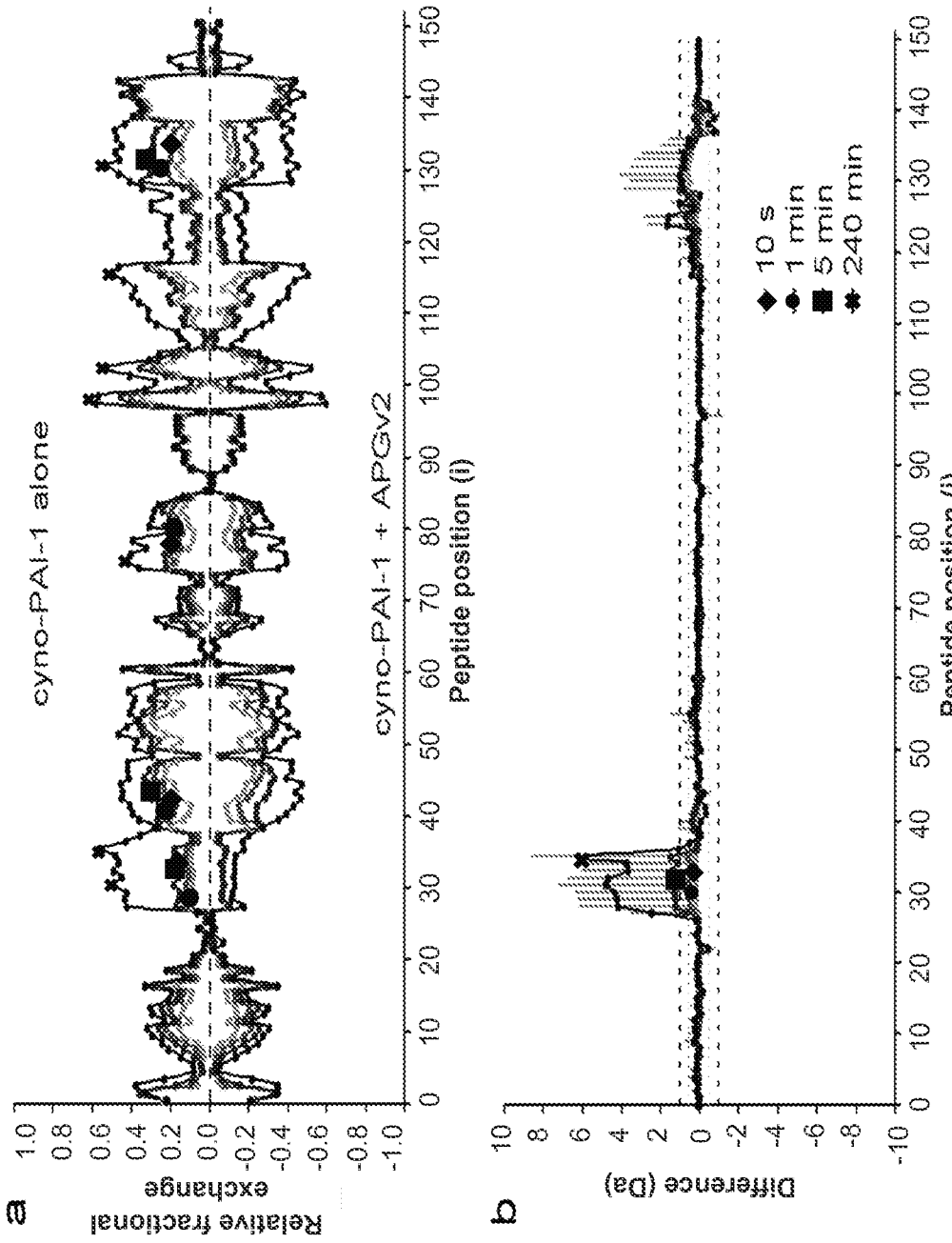

a
cymo-PAI-1 alone
cymo-PAI-1 + APGv2
Relative fractional exchange
Peptide position (i)
b
Difference (Da)
Peptide position (i)
10 s
1 min
5 min
240 min

FIG. 51

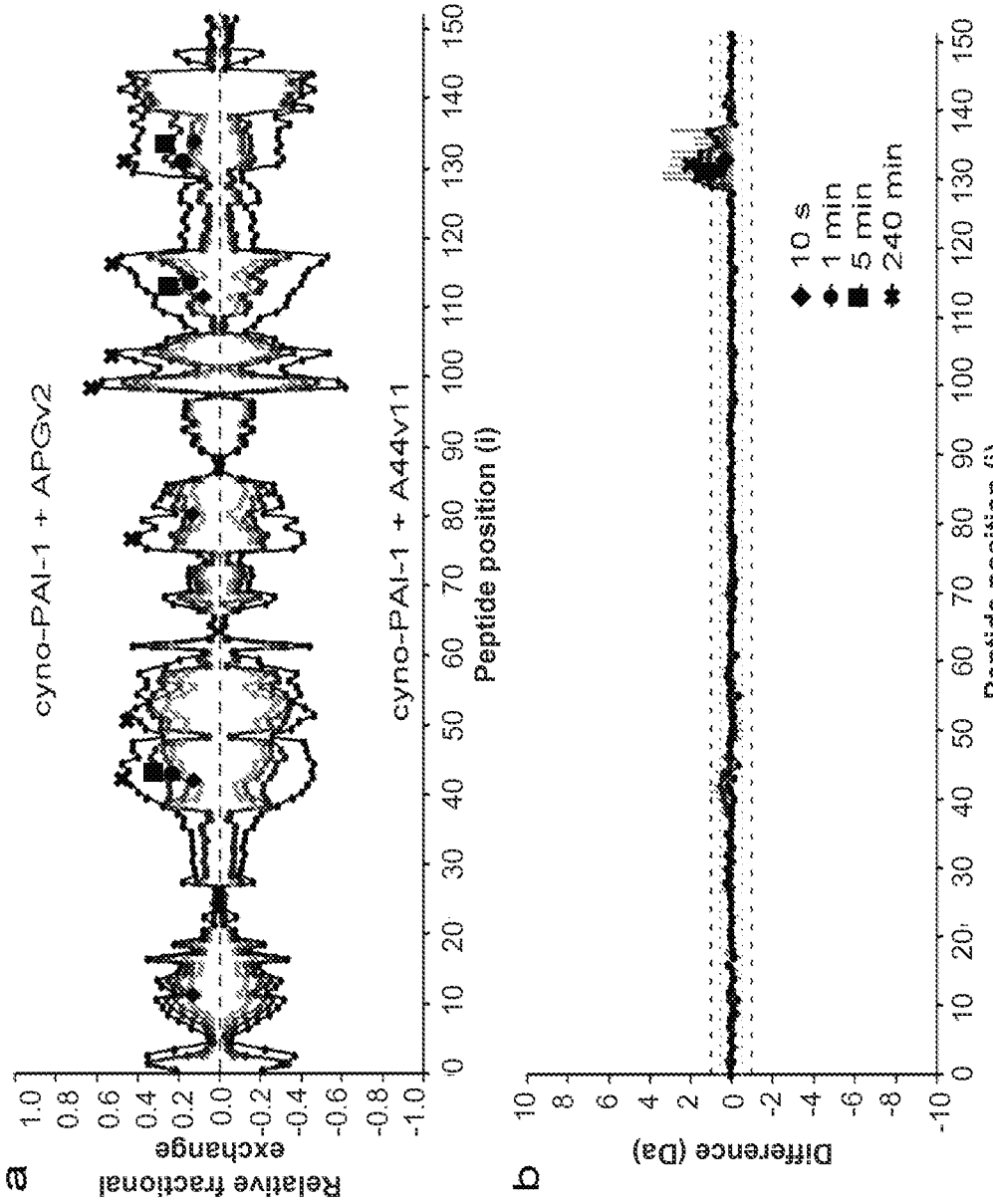

a
cyno-PAI-1 + APGv2
cyno-PAI-1 + A44v11
Relative fractional exchange
Peptide position (i)
b
Difference (Da)
Peptide position (i)
10 s
1 min
5 min
240 min

FIG. 52

VHHPPSYVAH LASDFGVRVF QQVAQASKDR NVVFSPYGVA SVLAMLQLTT
GGERQQLQA AMGFKIDDKG MAPALRHLYK ELLGPWNKDE ISTIDAIFVQ
RDLKLVQGFM PHFTRLFRST VKQVDFSEAE RAFFLINDWV KTHTKGMISD
LLGKGAVDQL TRLVLVNALY FNGHWKTPFP DSSTHRRLFH KSDGSTVSVP
MMAQTNKFNY TEFTTPDGHY YDILELPYHG NTLSMFIAAP YEKQVPLSAL
TNILSAQLIS HWKGNMTRLP RLLVLPKFSL ETEVDLRKPL ENLGMTDMFR
QFQADFTSLS NQEPLHVAQA LQKVKIEVNE SGTVASSSTA VIVSARMAPE
ELIMDRPFLF VVRHNPTGTV LFMGQVMEP
BOLD = HX MS epitope
= X-ray epitope

FIG. 53

	CAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGG CCATGGACGAGGGCATC (SEQ ID NO: 133)	(SEQ ID NO: 92)
LC2	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGCGTGGAAG GCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO: 134)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KSPKTLIYRAQRSVEGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLQPEDL GIYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 93)
LC3	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO: 135)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KSPKTLIYRANRSVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLQPEDL ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 94)
LC4	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGCGTGGAAG GCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO: 136)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KSPKTLIYRAQRSVEGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLQPEDL ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 95)
LC5a	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAG CTGCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGG CACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO: 137)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KAPKLLIYRANRSVDGVPSR FSGSGSGTDYTFTISSLQPEDI ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 96)
LC5b	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGG CCAGGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO: 138)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KAPKTLIYRANRSVDGVPSR FSGSGSGQDYTFTISSLQPEDI ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 97)
LC5c	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGT CTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGA	EIVMTQSPATLSLSPGERATL SCKASQDINSYLSWLQQKPG QAPRTLIYRANRSVDGIPARF SGSGSGQDYTLTISSLEPEDF

	ACCCTGATCTACCGGGCCAACAGAAGCGTGGACG GCATCCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGG CCAGGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAA CCCGAGGACTTCGCCGTG (SEQ ID NO: 139)	AVYYCLQYDEFPPTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 98)
	Protein	
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF (SEQ ID NO: 99)	
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 100)	

All variants, except poorly expressed variants 3 and 10, were tested in Biacore against human and cyno PAI-1 and Vitronectin-PAI-1 complex. The data is presented in Table 26.

Table 26: Characterization of humanization variants in a Biacore

Vitronection Chip / Human PAI-1			
mAb/hPAI-1/Vn	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**
A44 parental *	5.68E+06	2.29E-04	4.04E-11
A44-hv1*	1.10E+07	5.55E-04	5.26E-11
A44-hv2**	2.99E+06	4.03E-04	1.35E-10
A44-hv4*	4.59E+06	8.80E-05	1.92E-11
A44-hv5*	2.72E+06	2.76E-05	1.02E-11
A44-hv6*	4.38E+06	5.68E-05	1.33E-11
A44-hv7**	4.14E+06	3.94E-04	9.64E-11
A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6.36E+06	1.03E-04	1.70E-11
A44-hv11*	7.66E+06	1.22E-04	1.56E-11
A44-hv12*	5.15E+06	8.14E-05	1.61E-11
A44-hv13**	2.40E+06	4.36E-04	1.79E-10
A44-hv14*	4.06E+06	3.95E-05	9.57E-12
Vitronection Chip / Cyno PAI-1			
mAb/cPAI-1/Vn	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**

A44 parental *	3.98E+06	2.75E-04	6.96E-11
A44-hv1**	3.37E+06	8.27E-03	2.45E-09
A44-hv2**	2.30E+06	3.14E-04	1.37E-10
A44-hv4**	2.26E+05	1.70E-04	7.52E-10
A44-hv5*	3.40E+06	1.11E-04	3.26E-11
A44-hv6*	5.26E+06	2.51E-05	5.01E-12
A44-hv7**	2.50E+06	2.39E-04	9.56E-11
A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6.51E+06	1.34E-04	2.15E-11
A44-hv11**	1.56E+06	6.00E-04	3.87E-10
A44-hv12*	4.26E+06	2.35E-04	5.69E-11
A44-hv13**	2.12E+06	2.43E-04	1.15E-10
A44-hv14*	5.86E+06	2.13E-04	3.86E-11
Anti-human IgG Fc chip / human PAI-1			
mAb/hPAI-1*	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**
A44-hv11/hPAI-1	1.57E+06	6.68E-05	4.25E-11
A44-hv12/hPAI-1	1.62E+06	6.70E-05	4.14E-11
A44-hv13/hPAI-1	1.54E+06	2.52E-05	1.64E-11
A44-hv14/hPAI-1	1.25E+06	3.42E-05	2.70E-11
Anti-human IgG Fc chip / cyno PAI-1			
mAb/cPAI-1*	**ka1 (1/Ms)**	**kd 1 (1/s)**	**KD (M)**
A44-hv11/hPAI-1	1.87E+06	5.60E-05	3.00E-11
A44-hv12/hPAI-1	2.24E+06	5.45E-05	2.44E-11
A44-hv13/hPAI-1	1.89E+06	5.08E-05	2.70E-11
A44-hv14/hPAI-1	2.32E+06	2.69E-05	1.15E-11
n/a means the variant did not bind effectively to vitronectin/PAI-1 complex *1:1 molecular interaction model **Two state reaction (conformation change) model			

Biacore data did not reveal significant differences between humanized variants. All humanized variants, except variant 8, showed affinity to both cyno PAI-1 and human PAI-1 and PAI-

1 complexed to vitronectin within an acceptable range. In comparison to parental A44, humanization did not appear to change antibody affinity.

Although affinity and potency of the humanized variants didn't differ significantly in the chromogenic and Biacore assays, the ability of the variants to restore plasmin generation in the cellular assays was significantly lower than parental mouse antibody for some variants (see Table 27 summarizing comparison of chromogenic assay and cellular assay below). Humanized variants 11 – 14 were tested for the ability to block PAI-1 in the cellular assay.

Table 27: Characterization of humanization variants 11-14 in plasmin generation

	Plasminogen Activation		
mAb	**IC50 (nM)**	**Y50%**	**n**
A44	3.13	79.79	6
A44-hv11	2.01	85.82	6
A44-hv12	1.99	76.70	6
A44-hv13	1.82	71.10	6
A44-hv14	1.82	61.22	6
A44-hv9	1.51	50.92	4
A44-hv1	2.08	58.50	2

Variants 11 through 14 showed good potency in the plasmin generation assay and were further characterized in additional in vitro assays.

8) Characterization of humanization variants in human liver

Additional screening of the humanized variants 11 – 14 was performed using endogenously produced human PAI-1 from human plasma and human fibrotic liver samples.

PAI-1 activity was evaluated by measuring the ability of this serpin to form a stable complex with urokinase immobilized on 96 well plates. After washing unbound PAI-1, uPA-PAI-1 complexes were detected by the use of polyclonal antiPAI-1 antibodies. The bound polyclonal anti-PAI-1 antibodies (which is proportional to active PAI-1 in the sample) was then detected by using a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Molecular Innovation Cat. No. HPAIKT). Various concentrations of A44 humanized variants were incubated for 15 minutes at room temperature with either human or cynomolgus recombinant PAI-1 (0.31 nM final concentration) and then tested for functional active PAI-1 by uPA-PAI-1 complex using the ELISA described above. Samples were compared to a human PAI-1 standard. Human plasma from high BMI patients with

high active PAI-1 levels were diluted 4-fold and were incubated with increasing amounts of A44 humanized variants. Remaining active PAI-1 levels were determined using uPA-PAI-1 complex detection by ELISA. Cyno recombinant PAI-1 neutralization was also tested by plasmin generation to confirm cross-reactivity.

Table 28: Humanized variant ability to block endogenous PAI-1 activity

hPAI-1 Standard			hPlasma TH1782				Cyno PAI-1		
IC50(nM)	Y50%	n	mAb	IC50(nM)	Y50%	N	IC50(nM)	Y50%	n
1.31E-01	50.80	2	**A44-hv11**	1.57E-02	37.50	2	4.24E-02	50.80	2
1.14E-01	53.45	2	**A44-hv12**	3.35E-03	37.68	2	2.66E-02	53.45	2
1.66E-01	52.82	2	**A44-hv13**	3.11E-02	61.35	2	2.81E-02	52.82	2
5.63E-02	52.47	2	**A44- hv14**	5.86E-02	73.90	2	2.87E-02	52.47	2

Human fibrotic liver samples (provided by Biopredic International, Rennes, France from surgical resection of hepatic colon metastasis) were homogenized as follows: weighed frozen liver samples were homogenized in dry tubes containing ceramic beads (Cat No 03961-1-003, Bertin Technology, France) using Precellys homogeniser (Bertin Technology, France; 4°C, 2x30seconds at 6800 rpm) and then dissolved using 1 ml/g of lysis buffer (NaCl 1.5M in TBS – Tris Buffer Solution 0.1M Tris + 0.15M NaCl pH7.4). After centrifugation at 4°C at 5000g for 10min, the liver lysate in the supernatant was harvested and stored frozen at -80°C. Total protein concentration using standard BCA assay and active & total PAI-1 levels (determined by UK-PAI complex ELISA provided by Mol Innov Cat No HPAIKT & Cat No MPAIKT-TOT) were performed following manufacturer instructions by plotting standard human PAI-1 concentration vs A450nm using Biostat Calibration software. Increasing concentrations of A44 humanized variants incubated with liver lysate diluted to 2.5 nM of active PAI-1 were evaluated as described previously and data analyzed. Inhibition of PAI-1 activity (PAI-1 activity without mAb being 0% inhibition, no significant and dose-dependent inhibition of PAI-1 occured with IgG1) was calculated for each mAb concentration. Percent inhibition of PAI-1 activity was plotted as a function of mAb concentration and IC50 was determined Imax using Biostat speed software. Data is shown in Figure 17 and in Table 29.

Table 29: PAI-1 activity neutralization by A44-hv11 in human liver

	IC50 (nM)	Imax (%)
A44-hv11 (1 nM)	0.0365	99.997
A44-hv11 (2 nM)	0.0503	99.99
A44-hv11 (3 nM)	0.0465	99.99
Mean +/- sem	0.0444 +/- 0.004	99.99

Based on the above data, A44-hv11 was selected for further characterization in additional structural studies and additional in vitro and in vivo studies.

Example 13: Humanization of APG antibody by Grafting

Humanization using grafting techniques has previously been reported (P. T. Jones, et al., Nature 1986, 321:522-525). The humanization of the anti-PAI1 murine antibody APG began with the murine light chain (SEQ ID NO: 148) and murine heavy chain (SEQ ID NO: 149) from German Patent App. No. DE2000153251; this murine antibody is also described in Debrock et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337(2):257–266 (1997). Identifying the germline and canonical classes of the HC and LC chain of the murine antibody yielded muIGHV1-39 and muIGKV14-111, respectively. Next the list of close human germlines to anti-PAI1 APG variable domain light and heavy chains were identified and ranked by percent identity. Both steps were done by performing a BLAST search *vs.* all the human germlines which were systematically enumerated (all possible combinations of the V & J domains for the kappa and lambda chains; V, D and J domains for the heavy chains). The BLAST searches were performed using the IMGT/DomainGapAlign tool provided at http://www.imgt.org. (*See* Ehrenmann, *et al. Cold Spring Harbor Protocols* 2011.6 (2011)). The closest human germlines were identified with 67.4% and 63.3% sequence identity to anti-PAI1 APG variable domain light and heavy chains, respectively. Using the IMGT database, the light chain was found to be close to HuIGKV1-33 and the heavy chain was close to HuIGHV1-46. The closest human germline to the anti-PAI1 APG variable domain heavy chain with a matching canonical class was found to be HuIGHV7-4-1 with a sequence identity of 62.2%.

CDR regions (based on a combination of Kabat and IMGT for APG) and Vernier residues are indicated in italics for the parent murine APG (mAPG) light chain (SEQ ID NO: 148), IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (IGKV1a) (SEQ ID NO: 107) and for IGKV1-33-01_IGKJ2-02 (IGKV1b) (SEQ ID NO: 150) (see Table 30, below). Vernier residues as defined in Foote, et al. *J. Mol. Biol.* 224(2):487-99 (1992) are underlined. The humanizing mutations (in boldface) were obtained by performing a pairwise comparison of the two aligned sequences, excluding the CDR & Vernier zone residues (also underlined in mAPG sequences, Table 30) as defined above. No further engineering was performed on the murine APG antibody. These humanized antibodies were named APGv2 and APGv4.

Table 30: APG humanization sequences

APG Light Chain	D*I*K*L*TQSPSS MYASLGERVT ITC*KASQDIY SYLSWF*QQKP GKSPK*TLIYR ANRLID*GVPS RFS*GSGSGQD Y*SLTISSLEY EHMGIYYC*LQ YDEFPFT*FGS

	GTKLEIK (SEQ ID NO: 148)
APG Heavy Chain	QVKLQESGPE LVKPGASVKI SCKASGYSFT DYNMNWVKQS KGKSLEWIGI IHPNSGTTTY NQKFKGKATL TVDQSSSTAY LQLNSLTSED SAVYYCARSK LRFFDYWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO: 149)
IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (IGKV1a)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YDNLPLTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO: 107)
IGKV1-33-01_ IGKJ2-02 (IGKV1b)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YDNLPCSFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO: 150)
IGHV7-4-1-02_ IGHJ4-03	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWM GWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARx xxxxYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 151)
IGHV1-46-01_ IGHJ4-03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWM GHNPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARxx xxxYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 152)
APGv2_VL2	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIY SYLSWFQQKP GKAPKTLIYR AN RLIDGVPS RFSGSGSGQD YTFTISSLQP EDIATYYC LQ YDEFPFT FGQ GTKLEIK (SEQ ID NO: 153)
APGv2_VH2	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKAS GYSFT DYN MNWVRQA PGQGLEWIGI IHPNSGTTTY NQKFKGRAVL SVDQSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCARSK LRFFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 154)
APGv4_VH4	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS GYSFT DYN MNWVRQA PGQGLEWI GI IHPNSGTT TY NQKFKGRATL TVDQSTSTAY MELSSLRSED

	TAVYYC *ARSK LRFFDY* WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 155)

Engineered sequences

4D humanization and grafting approaches were applied to the human germline sequence matches described above. For the engineered light chain sequences, APGv2 contains the murine light chain CDRs grafted into the human IGKV1-33 germline (APGv2 germinality index = 94% with IGKV1-33-01_IGKJ2-01). For the engineered heavy chain sequences, APGv2 and APGv4 contain the murine heavy chain CDRs grafted into the human IGHV7-4-1 and IGHV1-46 germlines respectively (APG_VH2 germinality index = 91% with IGHV7-4-1-02_IGHD6-25-01_IGHJ4-02; APG_VH4 germinality index = 91% with IGHV1-46-01_IGHD6-25-01_IGHJ4-02). See Table 30 above.

Combinations of Heavy and Light Chain Variant Sequences

For grafting, one version of the light chain (APGv2_VL2; SEQ ID NO: 153) and two versions of the heavy chain (APGv2_VH2; SEQ ID NO: 154 and APGv4_VH4; SEQ ID NO: 155) were created. APG_VL2 contains 15 mutations derived from grafting to the closest human germline sequence and retaining the murine CDR and Vernier zone residues. APG_VH2 contains 21 mutations derived from grafting to the closest human germline sequence with a matching canonical class and retaining the murine CDR and Vernier zone residues. APG_VH4 contains 20 mutations derived from grafting to the closest human germline sequence and retaining the murine CDR and Vernier zone residues. The delimitations of the CDRs for this grafting protocol are loosely based on the various different definitions available in the literature.

- APG_VL2 x APG_VH2 (mutations addressing humanization by grafting retaining CDRs and Vernier regions)
- APG_VL2 x APG_VH4 (mutations addressing humanization by grafting retaining CDRs and Vernier regions)

Two mAPG variants were generated during this humanization campaign, which were named APGv2 and APGv4. These variants were expressed and characterized in several *in vitro* assays as described below.

Example 14: Affinity Kinetics for APG antibodies by Surface Plasmon Resonance

Affinity to human glycosylated PAI-1 (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) was investigated by Surface Plasmon Resonance (SPR) for mouse APG and the two humanized variants (APGv2 & APGv4) using a Biacore 2000 instrument (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

First, the surface of a Sensor Chip CM5 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was prepared using routine amine coupling for the capture of the mouse and human anti-Fc (Anti-human IgG (Fc) antibody & Anti-mouse IgG antibody kits, GE Healthcare). All monoclonal antibodies (mAbs) were diluted to 5 nM using HBS-EP running buffer. Each purified mAb was captured for three minutes on a different flow cell surface. Human PAI-1 was injected at various concentrations (2.5, 5, 10, 20 and 40 nM) with short dissociation times in between and a long dissociation time at the end (contact time: 120 seconds, short dissociation: 90 seconds; long dissociation: 1800 seconds, flow rate: 50 µl/min). The chip was regenerated by glycine-HCl, pH 1.7 buffer after each round of antibody-PAI-1 binding. Kinetics data analysis was performed using Biacore BIAevaluation software. The sensorgrams were double-referenced by subtracting the reference flow cell values and the blank buffer values. The sensorgrams were fitted by using the simulated kinetics 1:1 (Langmuir) model with local Rmax. (see Figure 19). The data for the three APG antibodies are shown in Table 31.

Table 31: Binding Kinetics by Biacore Reverse Assay

Antibody		human PAI-1	
	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Dissociation Rate kd (1/s)	Affinity KD (M)
APG	3.82E+06	4.32E-04	1.131E-10
APGv2	6.58E+06	2.69E-04	4.080E-11
APGv4	9.48E+06	3.59E-04	3.800E-11

Example 15: Characterization of APG antibodies in human plasma

The mouse APG and the humanized variants APGv2 and APGv4 were screened for their ability to block PAI-1 according to the functional assays disclosed herein (see, e.g., Examples 6 and 9, above). Briefly, PAI-1 activity was evaluated by the ability of this serpin to form stable complex with urokinase immobilized on 96 well plates. After washing unbound PAI-1, uPA-PAI-1 complexes were detected by the use of polyclonal antiPAI-1 antibodies. The bound polyclonal anti-PAI-1 antibodies (which is proportional to active PAI-1 in the sample) was then detected using a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody according to manufacturer instructions (Molecular Innovation, Cat # HPAIKT).

Various concentrations of APG humanized variants (APGv2, APGv4) or parental mouse APG antibodies were incubated for 15 min at room temperature with undiluted human plasma having a high active PAI-1 level. Remaining active PAI-1 level was determined using uPA-PAI-1 complex detection by ELISA as described above (see, e.g., Example 6) and according to the manufacturer instruction.

Inhibition of PAI-1 activity was calculated for each mAb concentration. Percent inhibition of PAI-1 activity was plotted as a function of concentration of APG humanized variants (APGv2, APGv4) or parental mouse APG antibody. Biostat speed software was used to determine IC_{50} and I_{max} after three independent experiments (in duplicate)(see Figure 20) . Data is presented below in Table 32.

Table 32: Plasminogen Generation in Human Plasma

Antibody	IC_{50abs} mean± sem (nM)	I_{max} mean (%)
mAPG	1.81	89.7
APGv2	9.62 E-1	94.5
APGv4	1.28	94.4

Example 16: Clot lysis assay in human plasma: A44V11, mAPG, and APG variant activity

The fibrinolytic system is often altered in patients with stroke. A clot lysis assay can be used to determine fibrinolytic activity by measuring the degree of fibrin breakdown. See generally Lindgren, A. *et al.* Stroke 27:1066-1071 (1996). Clot lysis assays have been described in detail elsewhere. See, e.g., Beebe, et al. *Thromb. Res.* 47:123-8 (1987); Tilley et al., *J. Vis. Exp.67:e3822.*

The functional activity of A44V11 and other PAI-1 neutralizing antibodies was determined using a human plasma clot lysis assay. Briefly, the assay applied here induces clot formation using a mixture of Tissue Factor/Ca2+ in the presence of tPA and a concentration of PAI-1 known to inhibit clot lysis. Fibrin polymerization induces an increase of turbidimetry that was detected by absorbance measurement at 340 nm. The ability of the antibody to restore clot lysis was determined by incubating increasing doses of antibody with normal human platelet poor plasma.

Briefly, clot lysis experiments were performed in microtiter plates. Citrated human plasma (Biopredic International, Rennes, France) was incubated with anti-PAI-1 antibody or isotype controle IgG diluted in assay buffer (NaCl, Tris-HCl pH = 7.4). After 15 min incubation at room temperature, human glycosylated PAI-1 (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) was added to a final concentration

of 3 nM and incubated for an additional 10 min. t-PA (sctPA, Molecular Innovation) was then added to a final concentration of 1 nM. Clot formation was induced by an activation mix comprising Tissue Factor (Innovin®, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) diluted to a final concentration of 7.5 mM in calcium assay buffer ($CaCl_2$).

Kinetic reading of absorbance at 340 nm was performed every 30 sec for 5 hours with an iEMS microplate reader (ThermoFischer) or a SpectrostarNano (BMG Labtech). To quantify the effect on clot lysis, the area under curve (AUC) which reflects the balance between clot formation and clot lysis was calculated using GraphPad Prism Software. The restoration of clot lysis after antibody treatment was determined according to the following calculation:

$$Restoration = 100 \times \frac{AUC_{max\ lysis} - AUC_{treated}}{AUC_{no\ lysis} - AUC_{max\ lysis}}$$

IC_{50} and I_{max} were calculated using Biostat speed software.

The 1 nM concentration of t-PA yielded complete lysis of normal plasma within 2 hours. The 3 nM-concentration of PAI-1 inhibited t-PA-induced clot lysis. Addition of either t-PA or PAI-1 alone did not affect clot formation. Addition of neither t-PA or PAI-1 did not affect clot formation.

The A44V11 anti-PAI-1 antibody restored human platelet poor plasma clot lysis (*see* Figure 21), while the isotype IgG1 did not (*see* Figure 22). A44V11 exhibited an IC_{50} of 2 nM with an I_{max} of 103% at 100 nM (*see* Figure 23).

The humanized variants of APG anti-PAI-1 antibody also restored human platelet poor plasma clot lysis (*see* Figure 24). APGv2 exhibited an IC_{50} of 2.1 nM and an I_{max} of 114% at 100 nM. APGv4 exhibited an IC_{50} of 2.8 nM and an I_{max} of 116% at 100 nM (*see* Figure 25). The clot lysis data is summarized below in Table 33.

Table 33: Inhibition of clot lysis by anti-PAI-1 antibodies

Antibody	IC_{50} (nM)	Imax @ 100 nM
A44V11	1.38	113%
APG V2	2.08	114%
APG V4	2.82	116%
mAPG	2.34	123%

Example 17: Assessment of A44V11 Neutralization of PAI-1 in Primary Human Lung Cells

The effect of antibody A44V11 on neutralization of PAI-1 was investigated in a lung cell-based system. TGFβ is considered to be the most potent and ubiquitous profibrogenic cytokine. TGFβ has been shown to induce PAI-1 expression and inhibit the activities of t-PA and plasmin as well as

collagen degradation in cultured murine embryo fibroblasts (NIH3T3 cells). *See* Liu, R-M. *Antioxid Redox Signal.* 10(2): 303–319 (2008). Primary lung fibroblasts strains LL29 (CCL-134) and LL97A (CCL-191) from ATCC (Manassas, Virginia) were plated overnight in a 12-well plate at a concentration of 200,000 cells per well. Cells were incubated for 48 hours with A44V11 antibody or isotype control (IgG) and TGFβ (R&D Systems, Minneapolis, Minn., cat. #100-B-001) at a concentration of 5 ng/ml. After 48 hours, cell supernatants were harvested and analyzed by Western Blot for detection of PAI-1 forms with a rabbit pAb anti PAI-1 (abcam, ab66705).

Cells treated with A44V11 antibody after TGFβ stimulation display PAI-1 band as a doublet, which corresponds to the cleaved form of PAI-1 (see Figure 26, lane 5). Cells treated with control IgG do not show this doublet formation (see Figure 26, lane 6). This study demonstrates that treatment of primary human lung cells with A44V11 induces endogenous PAI-1 substrate conformation, which allows PAI-1 to be cleaved by protease.

Example 18: A44V11 increases activation of MMPs

Plasmin can activate MMPs, enzymes that can degrade most ECM proteins including collagen, the major proteinaceous component of fibrotic tissue. In this regard, plasmin is often cited as a general activator of MMPs. (See Loskutoff, *et al. J. Clin. Invest.* 106(12):1441-43 (2000)). PAI-1 decreases MMP activation and matrix degradation by blocking plasmin generation, followed by inhibition of fibroblast apoptosis. The ability of A44v11 to stimulate activation of MMPs was investigated in a lung cell-based system. Primary lung fibroblasts LL29 (CCL-134) and LL97A (CCL-191) from ATCC (Manassas, Virginia) were plated overnight in a 12-well plate at a concentration of 250,000 cells per well. Cells were incubated for 48 hours with A44V11 or isotype control (IgG) and Lys-Plasminogen (Molecular Innovation, cat. # HGPG-712) at a concentration of 0.1 μM. After 48 hours, cell supernatants were harvested and the activities of a variety of MMPs (including, for example, MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, and 14) were detected using a Sensolyte 520 Generic MMP Assay kit (AnaSpec, Fremont, CA, cat. # 71158) according to the manufacturer's instructions.

As shown in Figure 27, A44V11 stimulates the activation of plasmin-dependent MMPs in human lung fibroblasts. The chart shows two representative separate experiments. Cells treated with A44V11 and plasminogen showed substantially increased activation when compared to cells treated with an negative IgG1 antibody. This study demonstrates that A44V11 stimulates MMPs activation in a plasmin-mediated phenomenon.

Example 19: Analysis of A44V11 potency in lung fibrosis mouse model (bleomycin challenge)

Experimental lung fibrosis induced by bleomycin is a well-studied model of fibrogenesis supported by ample literature. This model of pulmonary fibrosis resembles that seen in humans and has been used to assess the effects of potential therapeutic agents as well as basic research. (see, e.g., Molina-Molina *et al. Thorax* 61:604–610 (2006)).

Pharmacodynamics study in bleomycin treated mice (fibrosis model)

Transgenic mice that express human PAI-1 (humanized PAI-1 transgenic mice) were generated by replacing the mouse PAI-1 (SERPINE1) gene CDS (exons and introns)(NCBI Ref. No. NM_008871) with the corresponding human wild type PAI-1 gene CDS (NCBI Ref. No. NM_000602.3; NC_000007.13)(see Klinger, K.W. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8548 (1987)) under the control of the endogenous mouse PAI-1 gene regulatory sequences in C57BL/6 x 129 mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Molecular cloning and generation of transgenic mice are performed according to conventional techniques and according to manufacturer and breeder instructions. Expression of human PAI-1 and non-expression of mouse PAI-1 was confirmed in homozygous mice. Both mRNA and protein levels were confirmed by standard qPCR and by ELISA, respectively. Female homozygous humanized PAI-1 transgenic mice aged 8-9 weeks and weighing 22-25g were used for these procedures. Rodent food and water were provided *ad libitum*.

Mice received 50µl of Bleomycin® (Sanofi, France) dissolved in 0.9% NaCl by intra-tracheal injection via microspayer at a dose of 2 mg/kg. Control mice received 50µl of 0.9% NaCl. For these procedures, mice were anesthetized with isoflurane (TEM, Lormont, France) by inhalation and then intubated with a 18G cannula. The cannula was connected to a ventilator fed with an oxygen/isoflurane mixture to maintain the anaesthesia. Following anesthetization, the microsprayer was introduced in the cannula for bleomycin injection directly into the lungs. Mice were then extubated and allowed to recover from anaesthesia. At day 4, after randomization in 3 groups, mice were treated once by intra-peritoneal administration of either A44v11 or negative control mouse IgG1 at 10 mg/kg in PBS (1 mg/ml).

At designated time points (day 7 or day 9) after bleomycin challenge, mice were anesthetized with a xylazine/ketamine mix and euthanized by chest opening. A blood collection was performed by intra-cardiac harvest on a citrate coated tube. Left bronchia was clamped and the left lung was removed and fixed with a fixator (FineFix®, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) under controlled pressure for histological analysis A cannula was then placed into the trachea for the broncho-alveolar lavage (BAL) procedure (1.5 ml of 0.9% NaCl injected and harvest in three injections of 0.5 ml). The

four lobes of the right lung were then harvested, cut in two pieces and lysed for protein analysis. All experiments were performed in accordance with European ethical laws and approved by internal ethical comity (CEPAL, sanofi).

A44V11 levels were determined using ELISA (Molecular Innovation, cat. # HPAIKT) with coated biotinylated human PAI-1 plates and detected using secondary anti mouse IgG sulfo-tag labeled (MesoScale Discovery, Gaithersburg, Maryland). For Day 7 mice treated with A44V11, the result was 200 nM in plasma, 11 nM in BALF and 12 nM in lung lysate.

As shown in Figure 28, administration of a single intra-peritoneal dose (10 mg/kg) of A44V11 at day 4 achieves nearly full inhibition of human active PAI-1 both in BAL fluid and in lung lysate in animals sacrificed at day 7 after bleomycin challenge. For day 9 animals, A44V11 (10 mg/kg) achieves nearly full inhibition of human active PAI-1 in lung lysates, but achieves only partial inhibition in BALF.

D-dimers, a fibrin degradation product, can be measured to assess the degree of fibrin breakdown. To measure fibrin degradation, the levels of D-dimer in BALF were detected by ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago, Asnieres, France) according to manufacturer instructions. D-dimer levels in the BALF of the A44V11-treated group were increased approximately 2.8-fold at day 7 and 1.6-fold at day 9 when compared to the IgG1 negative control group, suggesting A44V11 treatment increases fibrin degradation (see Figure 29).

Additional studies were performed to further assess A44V11 activity in reducing fibrosis in mouse lung challenged with bleomycin. For these studies, mice were subjected to a similar protocol to the pharmacodynamy study described above, except that the study duration length was 21 days from bleomycin challenge, and treatment with antibody (either A44V11 or IgG1 control antibody at 10 mg/kg) was repeated every 3 days starting at day 4 until day 20. At day 21 after bleomycin challenge, the animals were sacrificed as described above.

Increase in lung weight is known to be an indicator of increased fibrosis. The right lung weight, as a measure of fibrosis, was determined for mice in all experimental groups. As shown in Figure 30, bleomycin instillation induces an increase in right lung weight that was partially inhibited by repeated dosing of A44V11 antibody at 10 mg/kg. Repeated dosing using the IgG1 negative control antibody did not inhibit the increase in right lung weight due to bleomycin challenge. The reduction in bleomycin-induced right lung weight increase in A44V11-treated mice was statistically significant when compared to similar bleomycin-induced mice that were treated with IgG1 negative control antibody ($p<0.001$). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. This result indicates that A44V11 inhibits bleomycin-induced fibrosis in the humanized PAI-1 mouse lung, whereas a control IgG1 antibody does not.

Collagen accumulation in the lung is another known indicator of fibrosis. To assay collagen accumulation, lung tissues from mice sacrificed at day 21 were prepared and separated by HPLC, followed by the measurement of hydroxyproline. This technique is detailed elsewhere, for example in Hattori, *et al. J Clin Invest.* 106(11):1341–1350 (2000). In brief, lung tissue was prepared by hydrolysis under acidic condition (6M HCl) for 22 hours at 105°C, followed by evaporation. Primary amines were blocked in the lung tissue by OPA (phthalaldehyde), and proline/hydroxyprolines were specifically labeled using NBD (4-chloro-7-nitrobenzofurazan) (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA). Hydrolysates were then separated on Synergi™ 4 µm Hydro-RP 80 Å, LC Column 150 x 3 mm columns (Phenomenex, Torrance, CA, cat. # 00F-4375-Y0) using HPLC (Shimazu Corp., Kyoto, Japan) under acetonitrile gradient. Standard curves of known amounts of hydroxyproline were used as reference to quantify peak(s). A representation of the quantified data are shown in Figure 31.

Lung collagen accumulation as detected by hydroxyproline content was increased in bleomycin challenged animals. This increase in lung collagen accumulation was statistically reduced ($p<0.08$) by repeated dosing of A44V11 antibody at 10 mg/kg. (see Figure 31). Repeated dosing using the IgG1 negative control antibody did not inhibit the increase in lung collagen accumulation due to bleomycin challenge. The reduction in bleomycin-induced collagen accumulation increase in A44V11-treated mice was statistically significant when compared to similar bleomycin-induced mice that were treated with IgG1 negative control antibody ($p<0.05$). A44V11-treated mice showed approximately 44% less of an increase in collagen accumulation than IgG1 control-treated mice.

Example 20: Assessment of A44V11 activity in LPS challenge model in monkeys

An acute lipopolysaccharide (LPS) challenge model in monkeys was applied to determine the PAI-1 neutralization efficacy of A44V11 in vivo. The LPS challenge model is described in Hattori, *et al. J Clin Invest.* 106(11):1341–1350 (2000). The activity of A44V11 mAb on PAI-1 in monkey plasma and liver samples was evaluated. Specifically, the experiment was designed to assess the impact of a high dose of LPS (100 µg/kg - IV) on plasma and tissue levels of PAI-1 in the anesthetized monkey pre-treated (24 hours before) either with A44V11 (5 mg/kg, IP) or IgG1 (negative control, 5 mg/kg, intra peritoneal administration). Experiments were performed in accordance with European ethical laws and approved by internal ethical comity (CEPAL, sanofi).

Cynomolgus Macaca fascicularis (male and female) weighing 4 to 9 kg were food-deprived overnight before long-term anesthesia (at least 8 hours), including IM induction with Zoletil 50 (Virbac, Taguig City, Philippines) at 0.12 to 0.16 mL/kg followed by inhalation of a gaseous mix of air/oxygen and isoflurane (1 to 3%). Monkey body temperature was maintained within physiological ranges using a heating pad. After catheterization, LPS (Serotype 0127-B8) was administred as a 1 min

bolus in the cephalic accessory vein at a dose of 100 µg/kg (0.4 mL/kg). At various time points, blood samples and liver samples were taken. Blood samples (on citrate /EDTA) were harvested and centrifuged to isolate platelet poor plasma. Liver biopsies and terminal necropsy were stored at -80°C.

Active PAI-1, D-dimer and plasmin-α2 antiplasmin levels were determined using commercially available ELISA assays (Mol. Innovation, cat. # HPAIKT; Asserachrom D-Dimer; Plasmin-A2 antiplasmin, Diagnostica Stago) according to manufacturer instructions.

In plasma, active PAI-1 level decreases from about 30 ng/ml to below 10 ng/ml in all monkeys administered with A44v11. (See Figure 32(A)). There was no increase in active PAI-1 levels after LPS administration (100 ug/kg). (See Figure 32(A). In contrast, monkeys treated with negative IgG1 control show a strong increase in active PAI-1 levels following LPS administration, with a maximum occurring at about 4 hr (approximately 50 to about 250 ng/ml). (See Figure 32(B)). Thus, treatment with negative IgG1 control does not reduce the active PAI-1 levels in plasma that were strongly increased after LPS administration. (See Figure 32(B)).

In liver biopsy lysates, a similar phenomenon was observed. Monkeys that were treated with A44V11 mAb did not show an increase in active PAI-1 levels following LPS treatment. (See Figure 33(A)). In contrast, LPS administration induced a strong increase of active PAI-1 (up to 3 ng/mg) in liver biopsy lysates from negative IgG1 control-treated monkeys (see Figure 33(B)).

Simultaneously to PAI-1 neutralization, the D-dimer levels in A44V11-treated monkeys (see Figure 34(A)) was found to generally be higher than negative IgG control-treated monkeys (see Figure 34(B)) thus suggesting that A44V11 treatment in monkeys also induces an increase of fibrin degradation in plasma.

Finally, plasma samples of A44V11-treated monkeys showed an increased level of plasmin-α2 antiplasmin (PAP) complexes when compared to the PAP levels in negative IgG control-treated monkeys. (see Figure 35(A) and (B)). The increase in PAP complex and D-dimer in the presence of A44V11 indicates increases in plasmin generation.

Example 21: Assessment of A44V11 activity in Abdominal Adhesion Mouse Model

The effect of treatment with anti-PAI-1 antibody A44V11 on the formation of adhesions was evaluated in a mouse uterine horn model of surgical injury. The mouse uterine horn approximation and electrocautery procedure disrupts the serosal surface, causes thermal damage to the uterine tissue, and approximates damaged tissue surfaces during the healing process that ultimately results in post-surgical adhesions in 100% of untreated animals. The model and surgical procedure has been previously described in Haney A.F. et al., (1993). *Fertility and Sterility*, 60(3): 550-558.

For these adhesion studies, the transgenic female mice generated above that express humanized PAI-1 transgene, approximately 9 weeks old, weighing approximately 20g, were used. Forty-two mature transgenic female mice were divided into two groups and subjected to the surgical procedure designed to create adhesions between the uterine horns (UH), as described in detail in Haney A.F. et al., (1993). Briefly, each animal was anesthetized with isoflurane for the surgery according to IACUC guidelines, and a routine midline laparotomy was performed approximately 1.0 cm caudal to the xyphoid process. The UH were identified, approximated medially with a single 7-0 Prolene suture (Ethicon Inc., Somerville, N.J) carefully placed through the muscle wall of each horn, and the horns tied together immediately below the junction of the oviducts at the uterotubal junction. Care was taken not to damage the ovarian vascular supply. To induce electrocautery injury, a bipolar electro cautery unit was used (Valley Lab Surgistat, Solid state Electrosurgery Unit, Model No. B-20) on the medial surfaces of each uterine horn, covering an area of approximately 2x6 mm. The cautery unit was set as follows: Volts 100, 130 Hz, 50- 60 Amps. A 3 mm wide cautery tip was used with pure coagulating current at a setting of 3, power was initiated, and the tissue touched for 1 second at two burn spots per horn. The muscle incision was closed with 5-0 Vicryl, BV-1 taper needle (Ethicon Inc.) in a continuous suture pattern. Skin was closed with 5-0 Prolene, BV-1 Taper needle (Ethicon Inc.), in a horizontal mattress suture pattern.

Following the creation of the UH injury, Group 1 animals were treated with a volume of 0.16 mL of an Isotype Control antibody (30mg/kg), which was applied to the cautery burns. Group 2 animals were treated with a volume of 0.16 mL of A44V11 antibody (30mg/kg) in the same manner. For each group, animals were euthanized at 6 hours (n=5), 72 hours (n=4), or at Day 7 (n=12). (See Table 34 below). Animals that were scheduled for euthanasia at 72 hours and Day 7 had second dose of antibody (30mg/kg) injected intraperitoneally (IP) 48 hours after surgery.

Table 34: Treatment schedule for uterine horn injury studies.

Group	Treatment	Time point Euthanized	# of Animals	Dosing (30mg/kg)
Group 1	Isotype Control mAb (0.16 mL)	6 hours	5	Time 0
		72 hours	4	Time 0 + 48 hours
		Day 7	12	Time 0 + 48 hours
Group 2	Anti-PAI-1 A44 humanized mAb (0.16 mL)	6 hours	5	Time 0
		72 hours	4	Time 0 + 48 hours
		Day 7	12	Time 0 + 48 hours

Note: All animals had uterine horn approximated by suture and cautery burns created prior to treatment.

Efficacy Evaluation and Analysis:

Animals were euthanized at the indicated time points and the formation of adhesions was evaluated. Briefly, the length of the horns was measured from the uterine bifurcation to the approximation suture placed just below the oviducts. The two external sutures surrounding the uterine horns were removed and the length of adhesion between uterine horns was measured with the aid of a microscope, documented, and noted as present or absent (Yes/No). Also, any tissues involved in the adhesion formation will be recorded but may not be included in the length of adhesed area. The distribution of the average percent of adhesed length between uterine horns was checked for normality using the Shapiro-Wilk Test. The groups were compared with each other using Tukey Kramer analysis if normally distributed and Wilcoxon Rank-Sum analysis if not normally distributed. In all cases, a p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Animals treated with A44V11 showed significantly lower percent of length of adhesion formation between approximated uterine horns (see Table 35)

Table 35. Uterine Horn length measurement results.

Group	N	% of Length with Adhesions between the Uterine Horns (Mean ± SEM)
Isotype Control mAb (0.16 mL)	12	84 ± 3
A44V11 mAb (0.16 mL)	11	61 ± 7* (p=0.02)

*p= statistically significant relative to the Isotype Control by Wilcoxon Rank Sum Analysis, Chi Square Approximation

Detection of active PAI-1 and tPA levels

Following euthanasia, animals had blood (plasma), intraperitoneal fluid (IPF), and uterine horn samples collected for evaluation. Collection of samples were performed using conventional techniques. Plasma, IPF, and uterine horn samples were evaluated for active PAI-1 and tPA levels using ELISA. (Human PAI-1 Activity ELISA kits, Cat. # HPAIKT, Molecular Innovations, Novi, MI). Data was processed using Excel, JMP, and Prism Graph pad software. In all cases, a p-value $\leq$ 0.05 was considered statistically significant. At 6 hour and Day 7 time point, decreased levels of active PAI-1 were found in the IP Fluid and Uterine Horn Lysates in the animals treated with A44V11 versus Isotype Control. (See Figure 36). The decreased levels of active PAI-1 in the IPF at 6 hours was statistically significant result shown in IP Fluid at 6 hour time point in animals treated with A44 versus to Isotype Control ($p<0.001$ by Student T-test).

Example 22: Crystal Structure of Humanized Antibody A44V11

Expression and purification of Fab A44V11

Recombinant Fab (rFab) was obtained from transiently transfected HEK293 cells, using two plasmids encoding the light chain or the C-terminal His-tagged heavy chain. After centrifugation and filtering, rFab from the cell supernatant was applied to an immobilized-metal affinity resin. After elution from the resin, the rFab was extensively dialyzed against PBS & stored at 4°C.

Source of Macaca fascicularis PAI-1, referred as cynomolgous or cyno PAI-1:

Recombinant mature cynomolgous PAI-1 (24-402) was expressed as inclusion bodies in *E. coli* and the recombinant protein was purified using conventional methods.

Source of human PAI-1:

Recombinant mature human PAI-1 (24-402) was purchased from Molecular Innovations Inc. (catalogue number CPAI). It was a stabilized in active conformation by introducing mutations (N150H, K154T, Q319L, M354I), as described by Berkenpas *et al.* (1995, EMBO J., 14, 2969-2977).

Preparation & purification of the complexes:

Recombinant Fab & antigen were mixed at a 1.5:1 molar ratio, incubated 30 min at room temperature, and the complexes were further purified by preparative size exclusion on a Superdex 200 PG column (GE Healthcare), equilibrated with 25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl.

Crystallization of the Fab A44V11 + Cyno PAI-1 complex

The complex was concentrated to 10 mg/ml in 25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl. It crystallizes in 16-24% ethanol, 100 mM Tris pH 8.5. Ethylene glycol (30%) was used as cryoprotectant. Crystals diffracted to about 3.3Å in space group P321 (a=b=193Å, c=144Å) on ID29 beamline of ESRF. Data was processed with a combination of XDS and Scala (GlobalPhasing Ltd., Cambridge, UK)

Structure determination of the complex Fab A44V11/Cyno-PAI-1:

A model of the Fab variable domain was constructed using Prime in Maestro (Schrodinger, New York, NY). The constant domain was obtained from published structure 3FO2. Two different models of human PAI-1 were used: the latent conformation was obtained from 1LJ5, the active conformation from 1OC0. Calculation of Matthews Coefficient (V_M, crystal volume per unit of protein molecular weight) suggests that there are up to four complexes in the asymmetric unit (V_M 2.

2 assuming a complex size of 90 kilodaltons (KD). Molecular Replacement was done using Phaser (CCP4 suite)(McCoy, *et al. J. Appl. Cryst.* 40: 658-674 (2007), which identified two monomers of latent PAI-1 and two variable domains of Fab. Additional density was clearly visible for the constant domains, which had to be placed manually. This solution, which corresponds to a V_M of 4.3 (71% solvent), was also carefully examined for packing consistency. The structure was refined with Buster (GlobalPhasing) using non crystallographic symmetry, to an Rfree of 29.2% (Rfactor 25.8%). The constant domains are not stabilized by crystal packing and are poorly resolved in the electron density map.

Crystallization of the Fab A44V11 + Human PAI-1 complex

Protein crystallization is a bottleneck of biomolecular structure determination by x-ray crystallography methods. Success in protein crystallization is directly proportional to the quality of the protein molecules used in the crystallization experiments, where the most important quality criteria are purity and homogeneity (both molecular and conformational) of the proteins in solution.

Initially, to determine the PAI-1/Fab mAb complex structure a native mAb A44 was used to prepare its Fab fragment by papain digestion. This Fab scaled up preparation resulted heterogeneous Fab fragments which were complexed and purified in complex with human wild type (wt) PAI-1 protein. The obtained protein complex was concentrated to 7 mg/ml concentration and screened for crystallization under 800 individual crystallization conditions at two different temperatures, 4°C and 19°C. No crystallization hits were detected. In order to improve the protein complex homogeneity recombinant 6-His tagged Fab A44 was produced, purified and complexed with the human wild type PAI-1 protein (*see* Figure 36).

The complex crystallization screening resulted first crystallization hits under 20%PEG10K + 0.1M Sodium Acetate pH4.6 conditions. Crystallization optimization by conventional crystallization methods, Microseed Matrix Seeding, and *in situ* Trypsinolysis crystallization did not significantly improve the quality of crystals. The best obtained crystals were needle-like and were diffracting x-rays with insufficient resolution for structure determination (10Å).

The failure with the complex crystals crystallization could potentially be explained by the complex conformational heterogeneity. The wild type PAI-1 molecule is known to adopt three distinct conformations (active, latent, and substrate) which may interfere with crystallization. To improve the quality of the crystals, 6-His tagged A44 Fab in complex with latent PAI-1 was produced. (*see* Figure 37).

The corresponding complex was produced and screened for crystallization de novo and under conditions previously used for 6-His tagged Fab A44/wt PAI-1 protein complex. The only crystallization hit out of the more than 1000 conditions tested was identified for the complex under

20% PEG3350+0.2M nH4 Acetate +4% MPD + 50 mM Mes pH6 conditions (see Figure 39(a)). After extensive optimization 3D crystals were obtained. X-Ray diffraction tests using synchrotron high intensity X-Ray beam showed no diffraction sign (*see* Figure 39(b), depicting representative optimized crystals).

To reduce the flexibility of portions of the protein it was decided to produce A44 Fab fragment recombinantly but without an artificial tag such as the 6-His tag used previously. To further increase the chances for successful crystallization, an active form mutant of PAI-1 (N150H, K154T, Q319L, M354I) was purchased from Molecular Innovations (Cat. #CPAI, Novi, MI) and used for complex preparation with Fab A44 protein lacking artificial tag. The complex was concentrated to 12 mg/ml in 25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl. Acceptable rod-like single crystals were obtained in 10 % PEG3350, 100 mM ammonium sulfate and cryoprotected by the addition of 30% ethylene glycol (*see* Figure 40). These crystals diffracted to 3.7Å resolution, and after extensive cryoprotection optimization, resulted in an x-ray diffraction data set suitable for the structure determination (3.3Å). A dataset was collected to 3.3Å at beamline Proxima 1 of synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France). Spacegroup is P212121 (a=105, b=152 c=298). Data was processed using XDSme scripts (XDS ref, Xdsme ref).

Structure determination of the complex Fab A44V11 / Human-PAI-1:

Pointless (CCP4) indicated only a 40% confidence in spacegroup identification. In consequence, initial Molecular Replacement was carried out with Amore (CCP4) to test all possible space group variants of the P222 point group: P212121 was unambiguously confirmed. Final Molecular Replacement with Phaser (Phaser, CCP4) identified four dimers of active PAI-1/variable domain of Fab in the asymmetric unit. The constant domains were added manually in the electron density map. The structure was refined with Buster (GlobalPhasing) using non crystallographic symmetry, to a Rfree of 28% (Rfactor 24.1%).

Epitope and paratope structural analysis

Epitope and paratope regions were identified as formed in the cyno and human complexes, and the complexes were compared. The crystal structures were determined to 3.3Å for A44V11 in complex with human and cyno PAI-1. The superimposition of both structures (*see* Figure 40) shows that the paratope of A44V11 is similar for both latent and active forms of PAI-1. Fab A44 recognized the active form of human PAI-1 and the latent form of cyno PAI-1. Figure 42 depicts the PAI-1 epitope recognized by Fab A44 in both active human PAI-1 (Figure 42(A)), and latent cyno PAI-1 (Figure 42(B)). The paratope-recognizing the latent conformation is part of the paratope recognizing the active conformation.

PAI-1 interacts mostly with the heavy chain of A44V11, as can be seen from the analysis of the surface areas of interaction. Surface area of the interaction between active human PAI-1 and the heavy chain (average of 4 complexes) is 674Å^2. Surface area of the interaction between active human PAI-1 and the light chain (average of 4 complexes) is 372Å^2. Surface area of the interaction between latent cyno PAI-1 and the heavy chain (average of 2 complexes) is 703Å^2. Surface area of the interaction between latent cyno PAI-1 and the light chain (average of 2 complexes) is 360Å^2. See Figures 43 and 44 for depictions of the paratopes of the heavy chain and light chain, respectively.

The residues of the A44V11 part of the paratope are shown below in Table 36. Residues in italic are involved in the interactions with active PAI-1 but not the latent form, while residues underlined are interacting only with the latent form. All other residues are involved in both interfaces.

Table 36: A44V11 residues involved in paratope with PAI-1

Location	**Residues**
Heavy Chain (Figure 43)	
Loop H1	*Thr30*, Asn31, Gly32, Tyr33 and Asn35
Loop H2 and neighboring β-strands	Tyr47, Tyr50, Thr52, Tyr53, Ser54, Gly55, *Ser56*, *Thr57* and *Tyr58*
Loop H3	Trp98, Tyr100 and Tyr104
Light Chain (Figure 44)	
Loop L1:	Asn30 and Tyr32
Loop L2:	Arg50 and Arg53
Loop L3:	Tyr91, Asp92, *Glu93*, Phe94 and Pro96

Despite the different conformations of the human and cyno PAI-1 molecules, the same residues are involved in interactions with the Fab A44 (bolded residues shown below in the sequence of human PAI-1) (SEQ ID NO:1):

VHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTG
GETQQQIQAAMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRD
LKLVQGFMPHFFRLFRSTVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISHLLGT
GAVDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQT
NKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEVPLSALTNILSAQLI
SHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGM**TD**MF**RQFQADFT**SLS

DQEPLHVALALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIIDRPFLFVVRH
NPTGTVLFMGQVMEP

Short-hand for the A44V11 binding epitope for human PAI-1 is as follows:

E-X-X-Q (SEQ ID NO: 156);

L-X-R (SEQ ID NO: 157);

T-D-X-X-R-Q-F-Q-A-D-F-T-X-X-S-D-Q-E-P-L (SEQ ID NO: 158)

In summary, the cyno and human epitopes of PAI-1 recognizing FabA44 are identical in both conformations. Fab A44 recognizes both human and cyno PAI-1 but likely not mouse or rat PAI-1.

Example 23: Determination of A44V11 specificity and cross-reactivity

To determine the specificity and reactivity of A44V11, the sequence of the A44V11 epitope (see above) was used to search for similar epitopes in other proteins using a motif search with ScanProsite (SIB Swiss Institute of Bioinformatics) database. For additional details see Artimo, P. *et al.* Nucleic Acids Res. 40(W1):W597-603 (2012). All of the epitope sequence matches located in the search were related to PAI-1, suggesting that the A44V11 antibody is specific for PAI-1.

The A44V11 epitope was also compared to other known x-ray structures (3D search) using *in silico* profiling and molecular modeling according to Med-SuMo, which detects and compares the biochemical functions on proteins surfaces, including for example hydrogen bonds, charges, hydrophobic and aromatic groups. Med-SuMo molecular modeling is further described in Jambon, *et al. Bioinformatics* 21(20):3929-30 (2005). The 3D search of the A44V11 epitope located a similar motif in human alpha-1-antitrypsin (AAT1). However, upon further investigation, the AAT1 motif was found to have significant differences between the A44V11 epitope, such that A44V11 is unlikely to bind. Therefore, sequence pattern and 3D pattern analysis of the A44V11 epitope suggests that there should be minimal cross-reactivity with other human proteins.

The human and cyno PAI-1 epitopes for A44V11 were compared to proposed epitopes from mouse and rat PAI-1. Sequences are excerpted from SEQ ID NO:1 (PAI-1 human), SEQ ID NO:162 (PAI-1 cyno), SEQ ID NO:163 (PAI-1 mouse), and SEQ ID NO:164 (PAI-1 rat). Rat and mouse PAI-1 have respectively 75% and 79% sequence identity with human PAI-1. Alignment of the different PAI-1 sequences show significant differences between rat/mouse and human/cyno sequence in their respective epitopes, suggesting that A44V11 is unlikely to recognize rat or mouse PAI-1 (See Figure 45). For example, mouse PAI-1 amino acids Ser300, Thr302, Gln314 are different from the

human/cyno PAI-1 counterparts. The differences in these residues represent a change in proposed epitopes, such that mouse PAI-1 cannot be recognized by A44V11. The structural comparison of the mouse PAI-1 with the structure of the complex human PAI-1/A44V11 (Figure 46) further indicates that it should not be possible to obtain both human and mouse activity from the A44V11 antibody.

To further validate the identified epitope for A44V11, the human and cyno A44V11 epitopes were compared to binding regions of vibronectin. The structure of human PAI1 in complex with the somatomedin B domain of vibronectin has been published (1OC0). The structures of these two complexes were compared (see Figure 47). The structural comparison suggests that the binding of A44V11 will not impact PAI-1 interaction with vibronectin.

The A44V11 epitope was compared to the epitopes of other published anti-PAI1 antibodies. No overlap of the A44V11 epitopes was found with other published anti-PAI-1 antibodies MA-55F4C2 and MA-33H1, which bind residues in the 128-156 region (see Debrock et al. *Thromb Haemost*, 79:597-601 (1998)).

Finally, the specificity and lack of cross-reactivity of the A44V11 antibody was confirmed by Biacore. Based on the predicted unique sequence and 3D structure of the A44V11 epitope, molecular modeling studies indicate strongly that the A44V11 is specific for human and cyno PAI-1.

Example 24: Epitope Mapping by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDX MS)

Hydrogen/deuterium exchange (HDX) monitored by mass spectrometry (MS) was applied to the PAI-1-binding antibodies disclosed herein to further characterize the epitopes of each antibody. HDX MS is a particularly useful technique for comparing multiple states of the same protein. Detailed methodology and applications of HDX MS to protein therapeutics are disclosed in Wei, *et al.*, *Drug Discovery Today*, 19(1): 95-102 (2014). Briefly, if an aqueous, all-H_2O solvent is replaced with an isotope of hydrogen that has distinctive spectroscopic properties, then one can follow this exchange process. For most modern HDX experiments, deuterated or "heavy" water (D_2O) is used. In particular, the hydrogen bonded to the backbone nitrogen (also referred to as the backbone amide hydrogen) is useful for probing protein conformation. See, e.g., Marcsisin, *et al. Anal Bioanal Chem.* 397(3): 967–972 (2010). The exposed and dynamic regions of proteins will exchange quickly, while protected and rigid regions of proteins will exchange slower. All of the relevant conditions (pH, temperature, ionic strength, etc.) are kept constant, so only the difference in structure (solvent accessibility, hydrogen bonding) impacts this exchange. The interaction of the antibody with PAI-1 will block the labeling of certain portions of the antigen, thus producing a different readout based on the site of binding (epitope).

Experimental Method:

Stock solutions of cyno-PAI-1 (10 uM), cyno-PAI-1 bound to A44v11 (10 μm each) and cyno-PAI-1 bound to APGv2 (10 μm each) were prepared in PBS, pH 7.2. The protein solutions were allowed to reach binding equilibrium by incubating for 1 hour at room temperature. Based on a K_d value of <50 pM, each of the antibody:antigen complexes were >99% bound under the labeling conditions described below.

Deuterium exchange, quenching, and sample injection were handled by an automated robotics system (LEAP Tech., Carrboro, NC). An aliquot of the protein solution was diluted 10-fold with labeling buffer (PBS in 99.9% D_2O, pD 7.2) and allowed to incubate at 20 °C for 10 sec, 1 min, 5 min, or 4 hours. At the end of the deuterium exchange time point, the labeling reaction was quenched by adding 50 μL of the labeling solution to an equal volume of pre-chilled (0 °C) 100 mM sodium phosphate, 4 M guanidine hydrochloride, 0.5 M TCEP, pH 2.5. Undeuterated controls were prepared in an identical fashion by diluting 10-fold with PBS in H_2O.

Each quenched sample (50 μL, 50 pmol of each protein) was immediately injected into a Waters nanoAcquity with HDX Technology (Waters Corp., Milford, MA). The proteins were digested online with a 2.1 mm x 30 mm Enzymate BEH pepsin column (Waters Corp.) which was held at 20 °C. All of the chromatographic elements were held at 0.0 ± 0.1 °C inside the cooling chamber of the ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system. The resulting peptides were trapped and desalted for 3 min at 100 μL/min and then separated on a 1.0 x 100.0 mm ACQUITY UPLC HSS T3 column (Waters Corp.) with a 12 min, 2-40% acetonitrile:water gradient at 40 μL/min. Deuterium levels were not corrected for back exchange and were reported as relative. All comparison experiments were done under identical conditions, negating the need for back exchange correction. All experiments were performed in triplicate. Peptide carryover between injections was eliminated by injecting 50 μL of 1.5 M guanidine hydrochloride, 0.8% formic acid, and 4% acetonitrile over all columns after each run.

Mass spectra were acquired with a Waters Synapt G2-Si instrument equipped with a standard electrospray source (Waters Corp.) run in HDMSe mode. Instrument settings were as follows: capillary was 3.5 kV, sampling cone was 30 V, source offset was 30 V, source temperature was 80 °C, desolvation temperature was 175 °C, cone gas was 50 L/hr, desolvation gas was 600 L/h, and nebulizer gas was 6.5 bar. Mass spectra were acquired over an m/z range of 50-1700. Mass accuracy was maintained through each run by simultaneous infusion of 100 fmol/uL human [Glu1]-Fibrinopeptide B through the lockmass probe.

MSE identification of the undeuterated peptic peptides was preformed using ProteinLynx Global Server software (Waters Corp.). Deuterium uptake for each peptide was determined using DynamX 2.0 software (Waters Corp.). Relative deuterium levels were calculated by subtracting the

centroid of the isotopic distribution for undeuterated peptides from the corresponding centroid of the deuterium-labeled peptide. Deuterium uptake plots were generated automatically by the software.

Monitoring deuterium uptake for PAI-1 states

After online pepsin digestion,150 overlapping cyno-PAI-1 peptic peptides were identified, resulting in 95.3% sequence coverage (see Figure 48). Deuterium uptake was monitored (from 10 sec to 4 hours) in all 150 peptides for three different protein states: (1) cyno-PAI-1 alone; (2) A44v11 bound to cyno-PAI-1; and (3) APGv2 bound to cyno-PAI-1.

The majority of the cyno-PAI-1 peptides showed nearly identical deuterium uptake between the three states, which indicates that there is no interaction between cyno-PAI-1 and either mAb in these regions. See Figure 49(A), which depicts one representative peptide region with this result (residues 139-152). In contrast, peptides incorporating residues 44-64 showed significant protection from exchange (reduced deuterium uptake) when bound to either A44v11 or APGv2 (Figure 49(B)). In addition, peptides incorporating residues 295-322 also showed significant protection from exchange when bound to either A44v11 or APGv2 (Figure 49(C)). For this region, the magnitude of protection was greater when cyno-PAI-1 was bound to A44v11 rather than APGv2 (See Figure 49(C)). This indicates that A44v11 may provide greater overall protection from exchange than APGv2 when bound to cyno-PAI-1.

Comparison studies:

For comparison studies, deuterium uptake was monitored for all of the 150 peptides generated from each of the three cyno-PAI-1 states. (See, generally, Wei, *et al.*, *Drug Discovery Today*, 19(1): 95-102 (2014)). Data plots from each of the three states were compared to one another and a butterfly plot was generated to facilitate data interpretation (see, e.g., Figures 50(A), 51(A), and 52(A)). For each butterfly plot, the *x*-axis is the calculated peptide midpoint position, *i*, of each of the 150 peptides compared; the *y*-axis is the average relative fractional exchange (ratio).

Difference plots were also generated for each comparison between the cyno-PAI-1 states (see, e.g., Figures 50(B), 51(B), and 52(B)). In these plots, the deuterium uptake from one state is subtracted from the other and plotted similarly to the butterfly plots. The sum of the differences for each peptide is represented by a vertical bar. The horizontal dashed lines represent the values at which either individual measurements (±0.5 Da) or the sum of the differences (±1.1 Da) exceed the error of the measurement and can be considered as real differences between the two states. Additional details regarding this technique are disclosed in Houde D. et al., *J. Pharm. Sci.* 100(6):2071-86 (2011).

First, cyno-PAI-1 alone was compared to the A44v11:cyno-PAI-1 bound state (Figure 50). The butterfly plot for this comparison is shown in Figure 50(A). The difference plot for this comparison is shown in Figure 50(B). The observed differences between cyno-PAI-1 bound to A44v11 and free form cyno-PAI-1 are located primarily in two regions of cyno-PAI-1. One region is near the N-terminus (residues 44-64) and the other region is near the C-terminus (residues 307-321) (see Figure 50(B)).

Next, cyno-PAI-1 alone was compared to the APGv2:cyno-PAI-1 bound state (Figure 51). The butterfly plot for this comparison is shown in Figure 51(A). The difference plot for this comparison is shown in Figure 51(B). The observed differences between cyno-PAI-1 bound to APGv2 and free form cyno-PAI-1 are located primarily in two regions of cyno-PAI-1. One region is near the N-terminus and the other near the C-terminus, which is similar to the A44v11:cyno-PAI-1 result. The A44v11 and APGv2 complexes with cyno-PAI-1 share peptides showing reduced deuterium uptake when in the bound state, which may indicate that the epitopes for the two antibodies are similar.

Finally, the two antibody-bound cyno-PAI-1 states were compared to each other (Figure 52). The butterfly plot for this comparison is shown in Figure 52(A). The difference plot for this comparison is shown in Figure 52(B). The observed difference between A44v11:cyno-PAI-1 and APGv2:cyno-PAI-1 is located in the C-terminal region of cyno-PAI-1. (See Figure 52(B)).

Example 25: Epitope comparison of antibodies A44v11 and APGv2

HDX MS was used to further define the epitopes of the A44v11 and APGv2 antibodies. By using the overlapping peptides generated in HDX MS, an antibody epitope can be refined to slightly better than peptide-level resolution (for example, see Figure 48). The HDX MS data for the peptides which showed significant protection from exchange with A44V11 binding was further analyzed to determine the epitope for the cyno-PAI-1:A44v11 interaction. The HDX data for the A44V11 epitope of cyno-PAI-1 was found to be consistent with the epitope determined using the crystallography approach. The A44V11 epitope of cyno-PAI-1 identified using HDX MS appears in Figure 53 (bold), and below in shorthand format:

T-T-G-G-E-T-R-Q-Q-I-Q (SEQ ID NO: 159);
R-H-L (SEQ ID NO: 160);
T-D-M-X-X-X-F-Q-A-D-F-T-S-L-S-N-Q-E-P-L-H-V (SEQ ID NO: 161)

The HDX MS data for the cyno-PAI-1 peptides which showed significant protection from exchange with APGv2 binding was analyzed to further determine the epitope for the cyno-PAI-

1:APGv2 interaction. The HDX MS epitope mapping data for A44v11 and APGv2 show that the epitopes are in the same region, as seen generally in Figure 52. In the region of residues 307-321 the same peptides show protection in the antibody-bound state for both A44v11 and APGv2. However, the magnitude of protection is greater when cyno-PAI-1 is bound to A44v11 rather than APGv2 (see Figure 49(C)). This finding is more apparent in Figure 52(B), which depicts the difference peaks in the residue 307-321 region of cyno-PAI-1. This indicates that there are differences in the specific contacts made between cyno-PAI-1 and each of the A44V11 and APGv2 antibodies. Therefore, it appears that while the epitopes of both A44V11 and APGv2 are located in a similar region of PAI-1, the epitopes for each antibody are not the same.

What is claimed is:

Claim 1. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising:

(a) a heavy chain framework region and a heavy chain variable region, the heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 34, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and

(b) a light chain framework region and a light chain variable region, the light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 145, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

Claim 2. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 comprising:

(a) a heavy chain framework region and a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, and

(b) a light chain framework region and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93.

Claim 3. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 comprising:

(a) a heavy chain variable region that is at least 95% identical to the heavy chain variable region of the antibody of claim 2, and/or

(b) a light chain variable region that is at least 95% identical to the light chain variable region of the antibody of claim 2.

Claim 4. An isolated monoclonal antibody that binds to essentially the same epitope as the antibody of claim 1.

Claim 5. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising:

(a) a heavy chain framework region and a heavy chain variable region, the heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 34, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and

(b) a light chain framework region and a light chain variable region, the light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 36, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

Claim 6. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable region comprises SEQ ID NO: 6, and the light chain variable region comprises SEQ ID NO: 7.

Claim 7. An isolated monoclonal antibody that binds to essentially the same epitope as the antibody of claim 5.

Claim 8. A humanized monoclonal antibody that binds specifically to human PAI-1, wherein the antibody comprises:

(a) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 82, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 91, or an antigen-binding fragment thereof;

(b) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 83, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 92, or an antigen-binding fragment thereof;

(c) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 84, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof;

(d) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 85, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 91, or an antigen-binding fragment thereof;

(e) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 85, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof;

(f) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 94, or an antigen-binding fragment thereof;

(g) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 87, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof;

(h) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 88, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 96, or an antigen-binding fragment thereof;

(i) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 97, or an antigen-binding fragment thereof;

(j) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 90, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 98, or an antigen-binding fragment thereof;

(l) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof;

(m) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof; or

(n) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof.

Claim 9. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising

(a) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 22, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 21, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 20; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 25, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 24, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 23,

(b) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 28, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 27, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 26; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 31, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 30, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 29,

(c) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 40, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 39, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 38; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 43, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 42, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 41,

(d) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 46, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 45, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 44; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 49, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 48, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 47,

(e) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 52, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 51, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 50; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 55, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 54, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 53,

(f) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 58, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 57, and heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 56; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 61, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 60, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 59,

(g) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 64, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 63, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 62; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 67, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 66, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 65,

(h) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 70, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 69, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 68; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 73, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 72, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 71; or

(i) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 76, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 75, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 74; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 79, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 78, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 77.

Claim 10. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, that binds to essentially the same epitope on PAI-1 as the humanized monoclonal antibody of claim 8 or claim 9.

Claim 11. A method of restoring plasmin generation comprising administering to a subject in need thereof orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically, a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody.

Claim 12. The method of claim 11, wherein the method treats a condition comprising increased levels of fibrotic tissue.

Claim 13. The method of claim 12, wherein the condition is fibrosis, skin fibrosis, systemic sclerosis, lung fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, interstitial lung disease, chronic lung disease, liver fibrosis, kidney fibrosis, chronic kidney disease, thrombosis, venous and arterial

thrombosis, deep vein thrombosis, peripheral limb ischemia, disseminated intravascular coagulation thrombosis, acute ischemic stroke with and without thrombolysis, or stent restenosis.

Claim 14. The method of claim 11, 12, or 13 wherein the PAI-1 antibody comprises the antibody of any of the preceding claims.

Claim 15. Use of a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody for the manufacture of a medicament for treating a condition caused by increased levels of PAI-1 or increased sensitivity to PAI-1, comprising administering to a patient orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically.

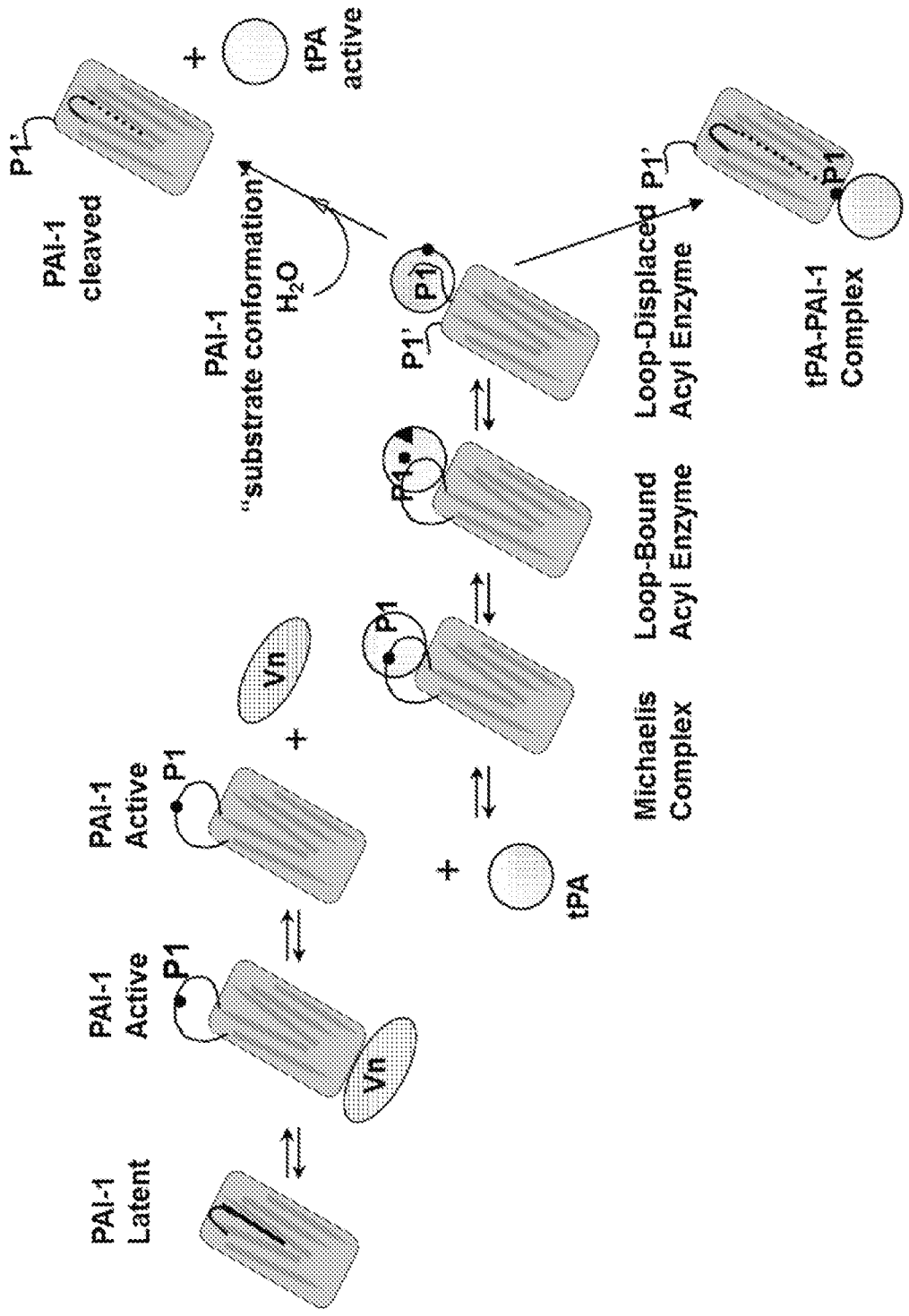

PAI-1
Latent
PAI-1
Active
P1
Vn
PAI-1
Active
P1
Vn
+
tPA
Michaelis
Complex
P1
Loop-Bound
Acyl Enzyme
P1'
P1
Loop-Displaced
Acyl Enzyme
P1'
P1
tPA-PAI-1
Complex
PAI-1
"substrate conformation"
H_2O
P1'
P1
PAI-1
cleaved
+
tPA
active

FIG. 1

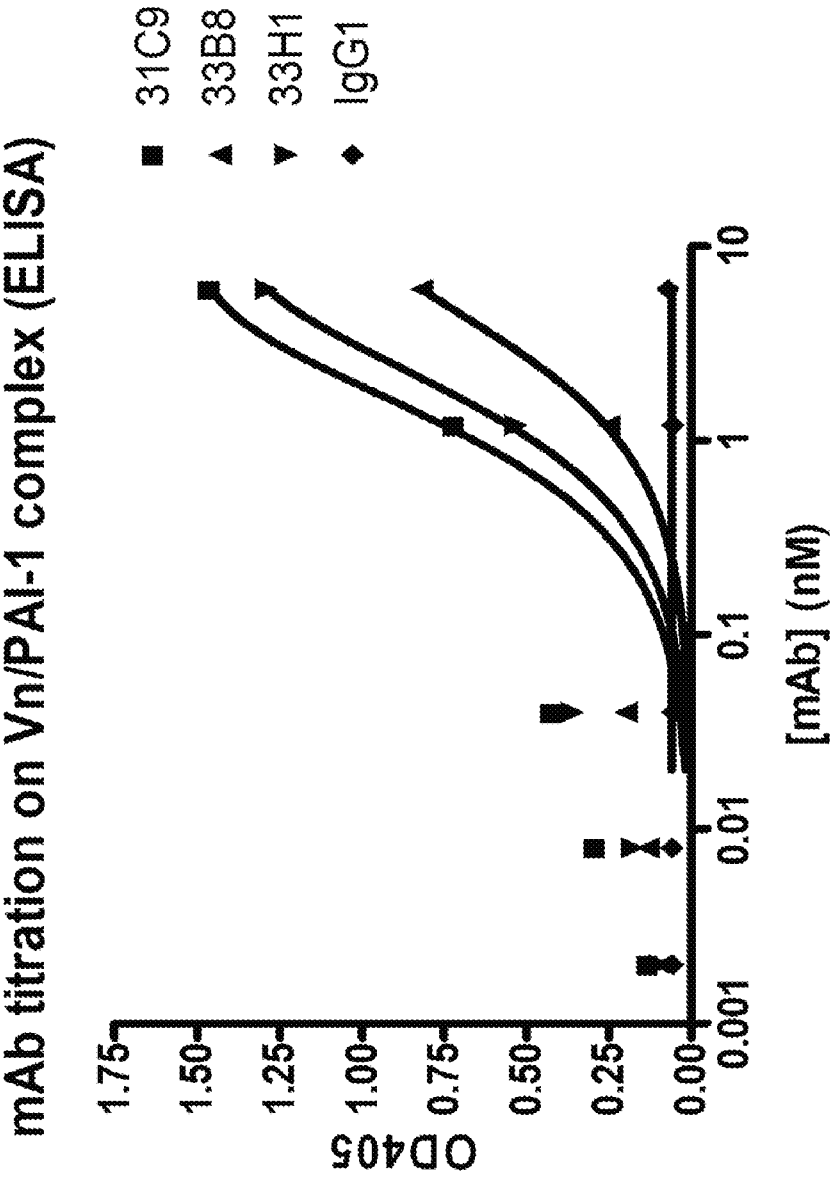

mAb titration on Vn/PAI-1 complex (ELISA)
31C9
33B8
33H1
IgG1
OD405
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
[mAb] (nM)

FIG. 2

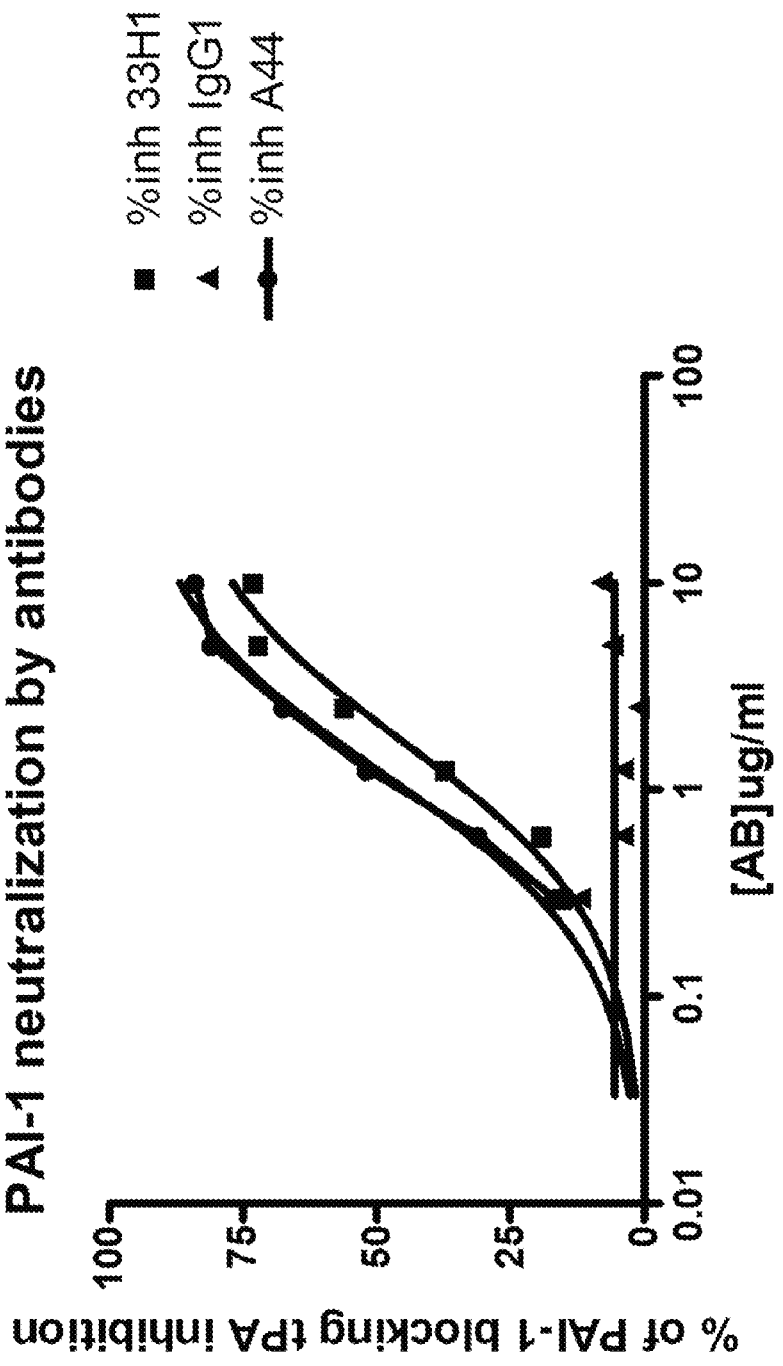
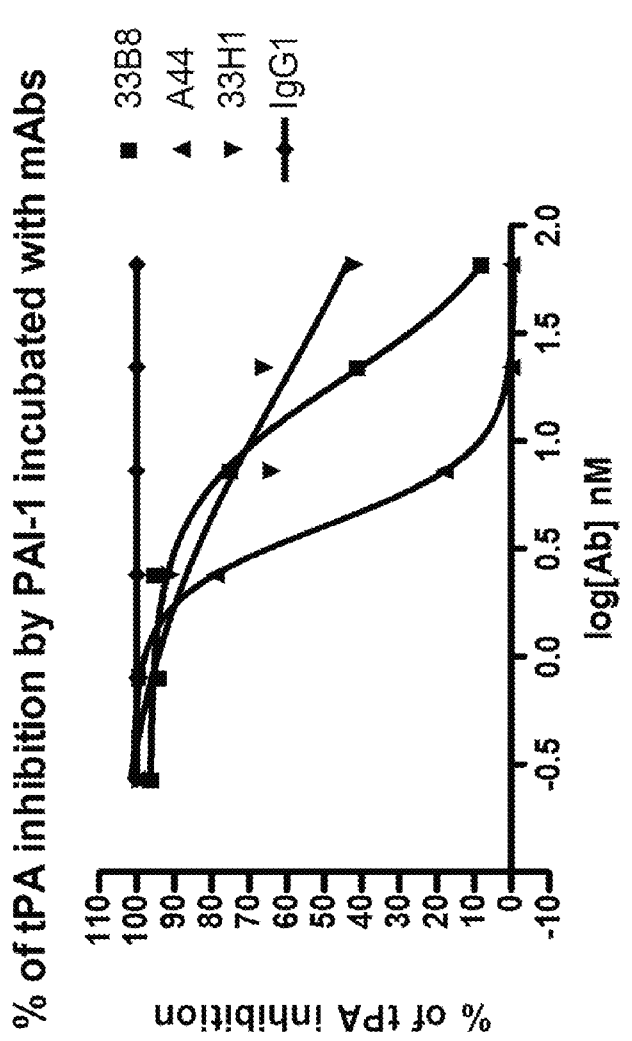
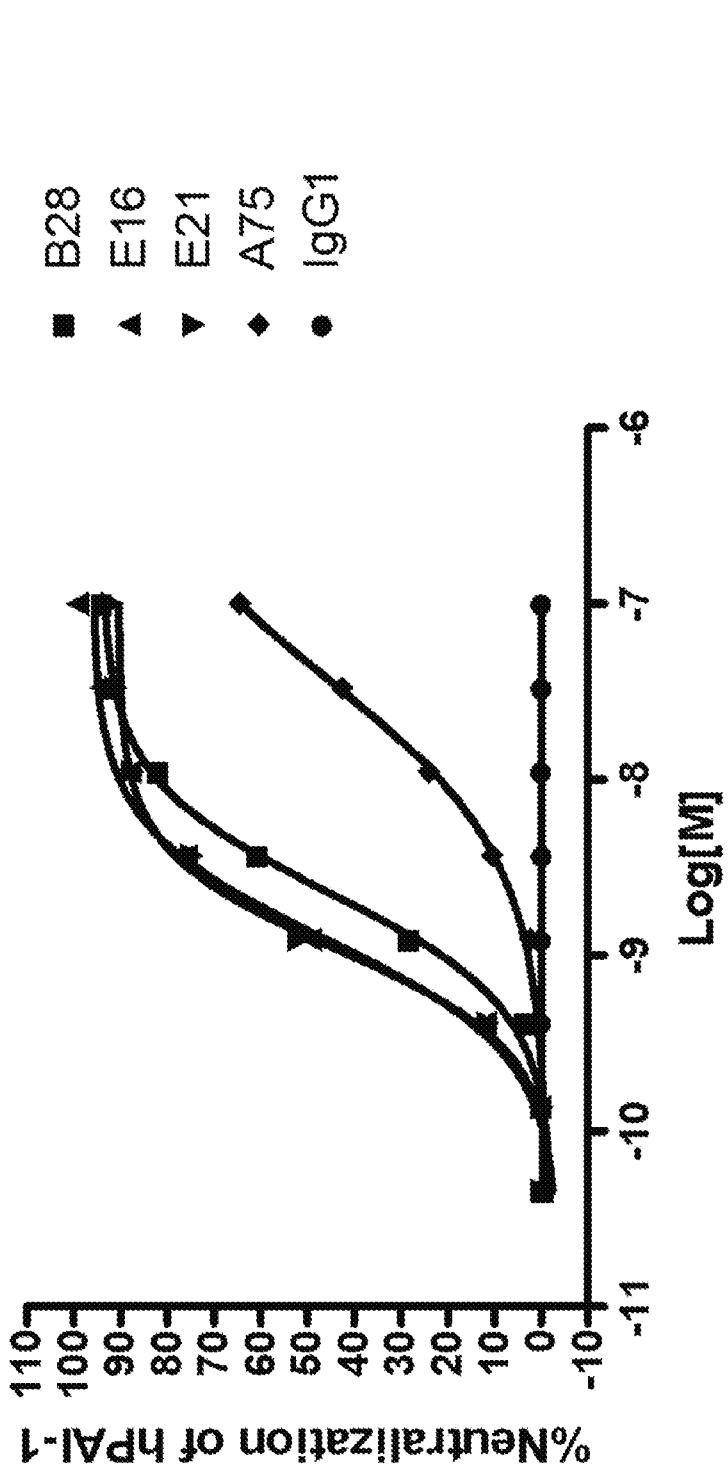

PAI-1 neutralization by antibodies
%inh 33H1
%inh IgG1
%inh A44
% of PAI-1 blocking tPA inhibition
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
[AB]ug/ml

FIG. 3



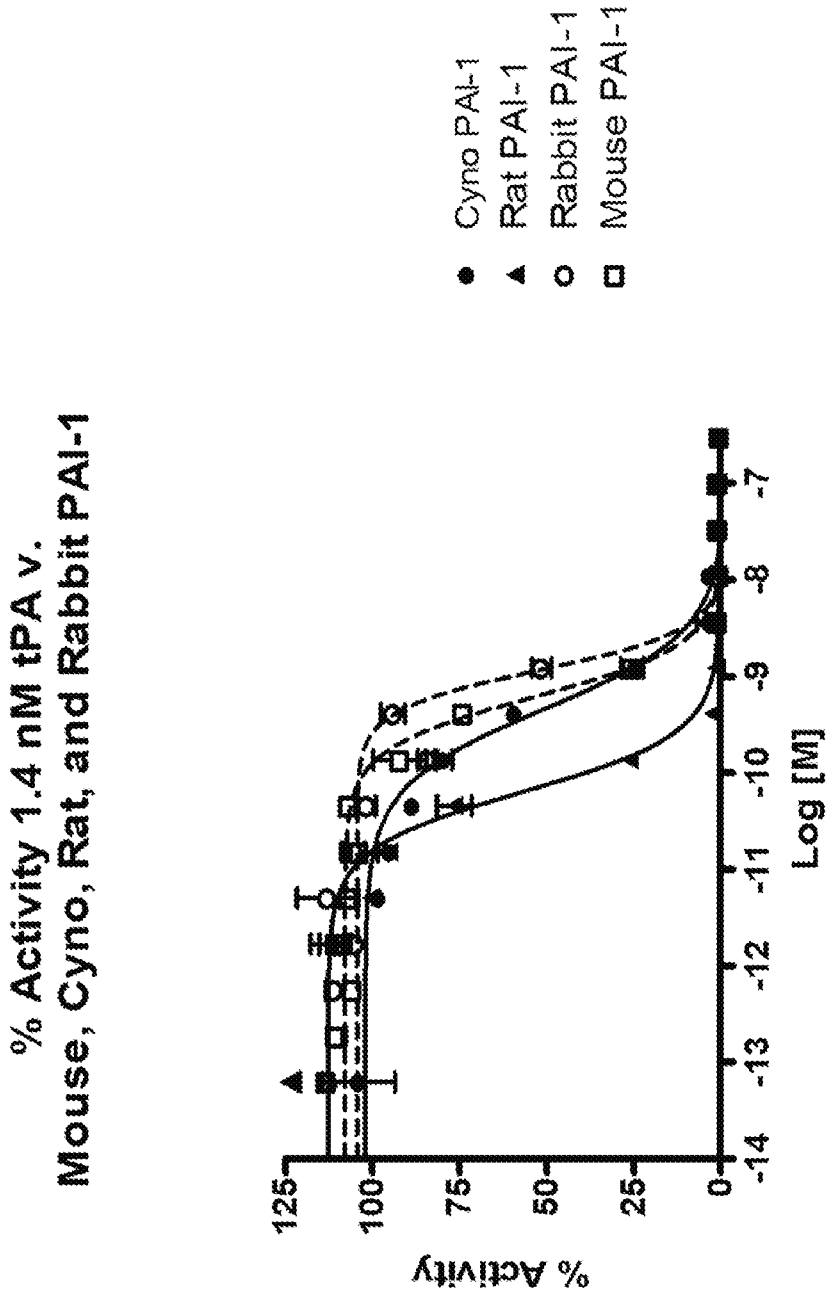
Sigmoidal dose-response (variable slope)	33B8	A44	33H1
Best-fit values			
BOTTOM	-7.036	-0.6570	14.38
TOP	96.59	100.8	108.9
LOGEC50	1.292	0.6048	1.249
HILLSLOPE	-1.449	-2.526	-0.5931
EC50	19.58	4.026	17.76

FIG. 4



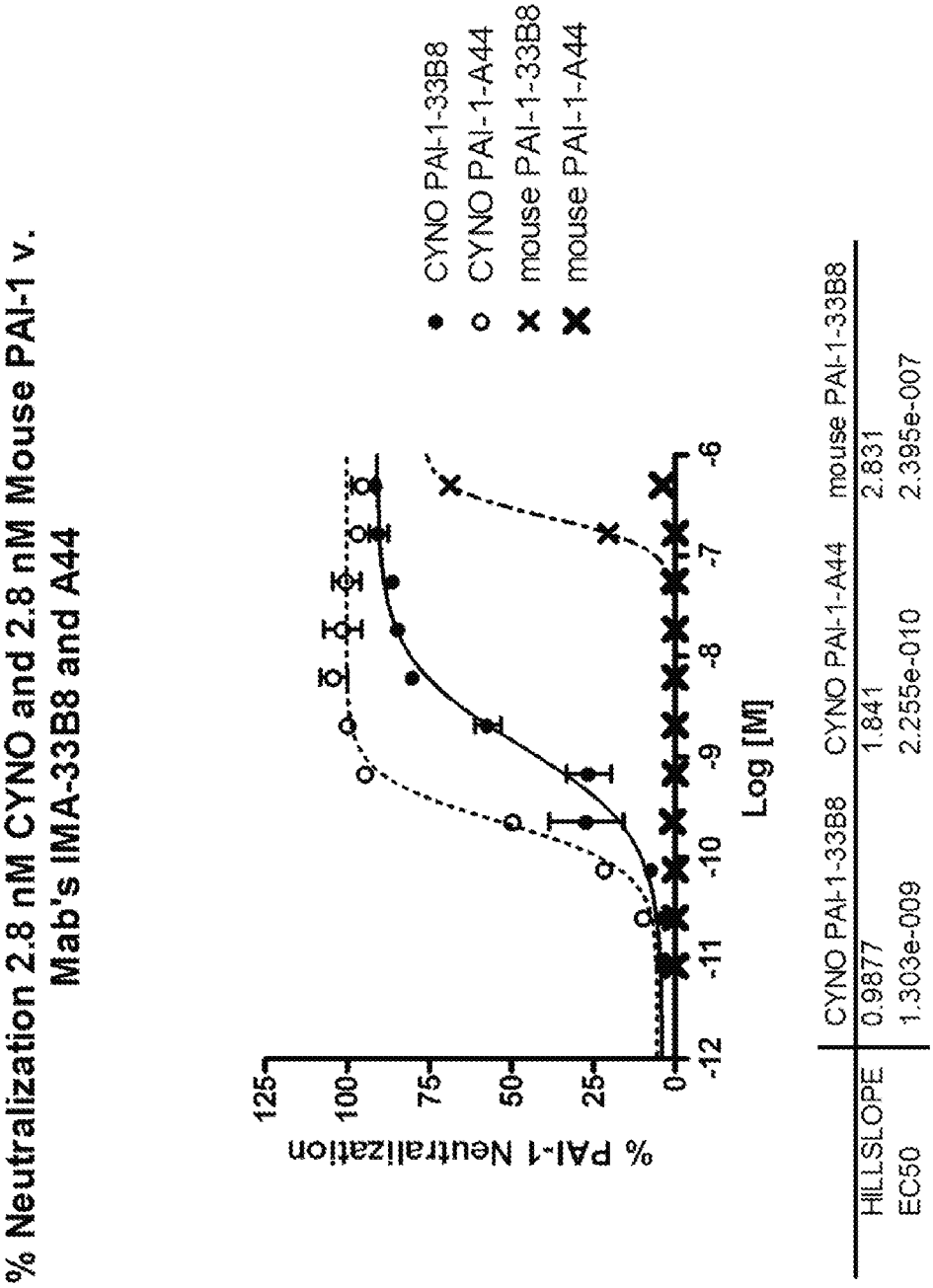
	B28	E16	E21	A75
HILLSLOPE	1.336	1.338	1.555	0.8527
EC50	2.302e-009	1.237e-009	1.081e-009	3.820e-008

FIG. 5



	Cyno PAI-1	Rat PAI-1	Rabbit PAI-1	Mouse PAI-1
HILLSLOPE	-1.087	-1.461	-2.079	-1.606
EC50	4.632e-010	6.425e-011	1.169e-009	6.143e-010

FIG. 6



	CYNO PAI-1-33B8	CYNO PAI-1-A44	mouse PAI-1-33B8
HILLSLOPE	0.9877	1.841	2.831
EC50	1.303e-009	2.255e-010	2.395e-007

FIG. 7

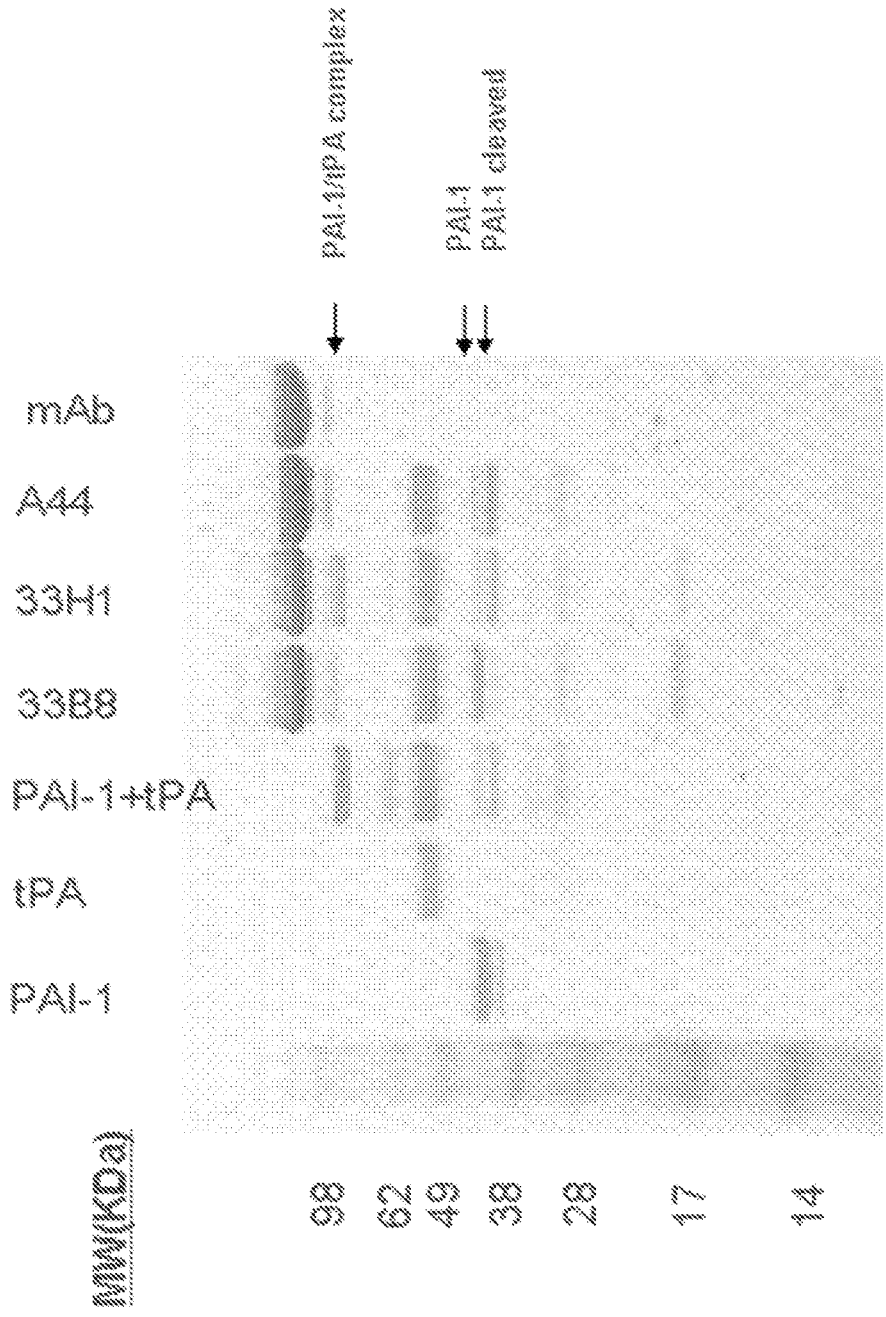

PAI-1/tPA complex
PAI-1
PAI-1 cleaved
mAb
A44
33H1
33B8
PAI-1+tPA
tPA
PAI-1
MW(KDa)
98
62
49
38
28
17
14

FIG. 8

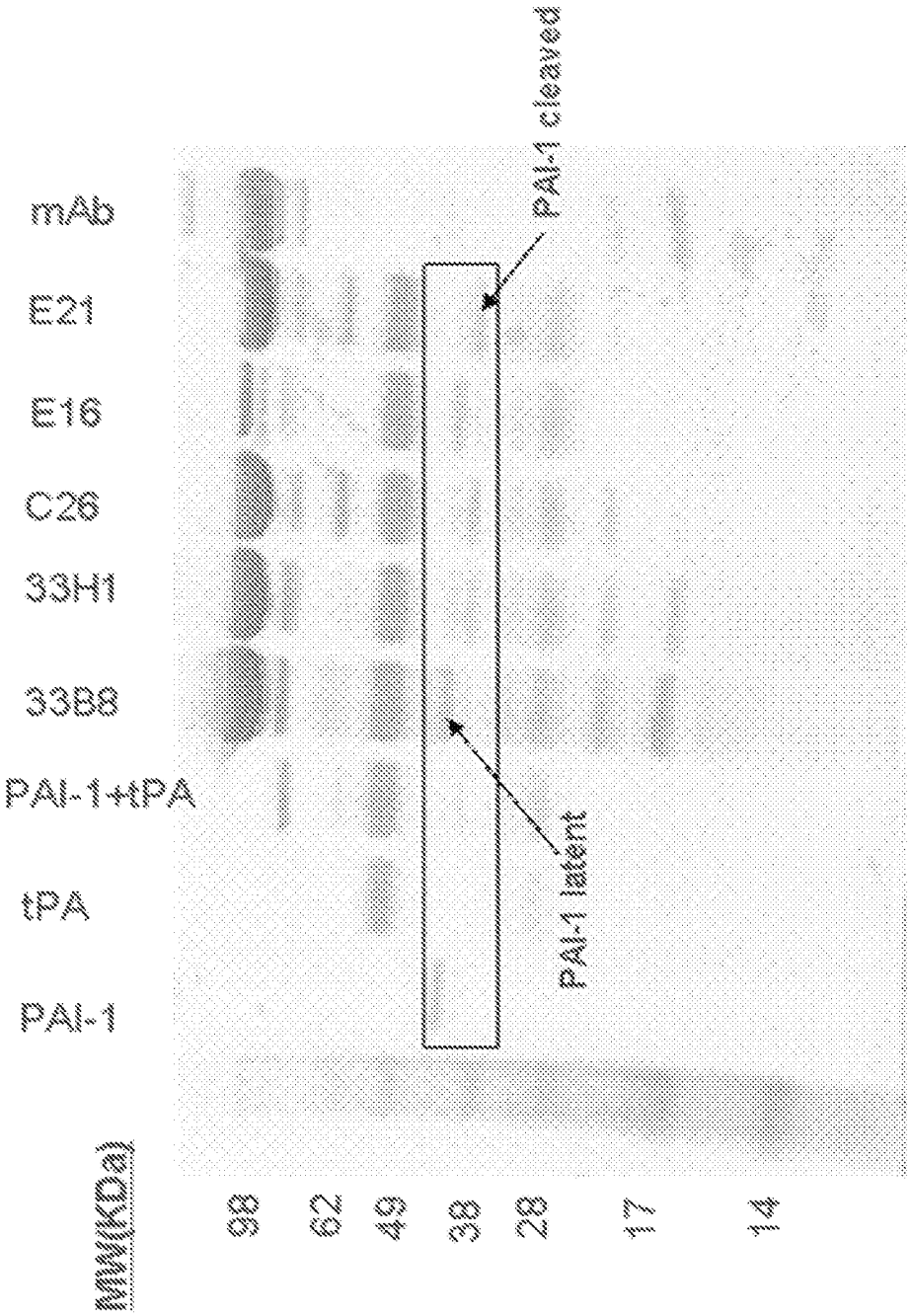

PAI-1 cleaved
mAb
E21
E16
C26
33H1
33B8
PAI-1+tPA
tPA
PAI-1
PAI-1 latent
MW(KDa)
98
62
49
38
28
17
14

FIG. 9

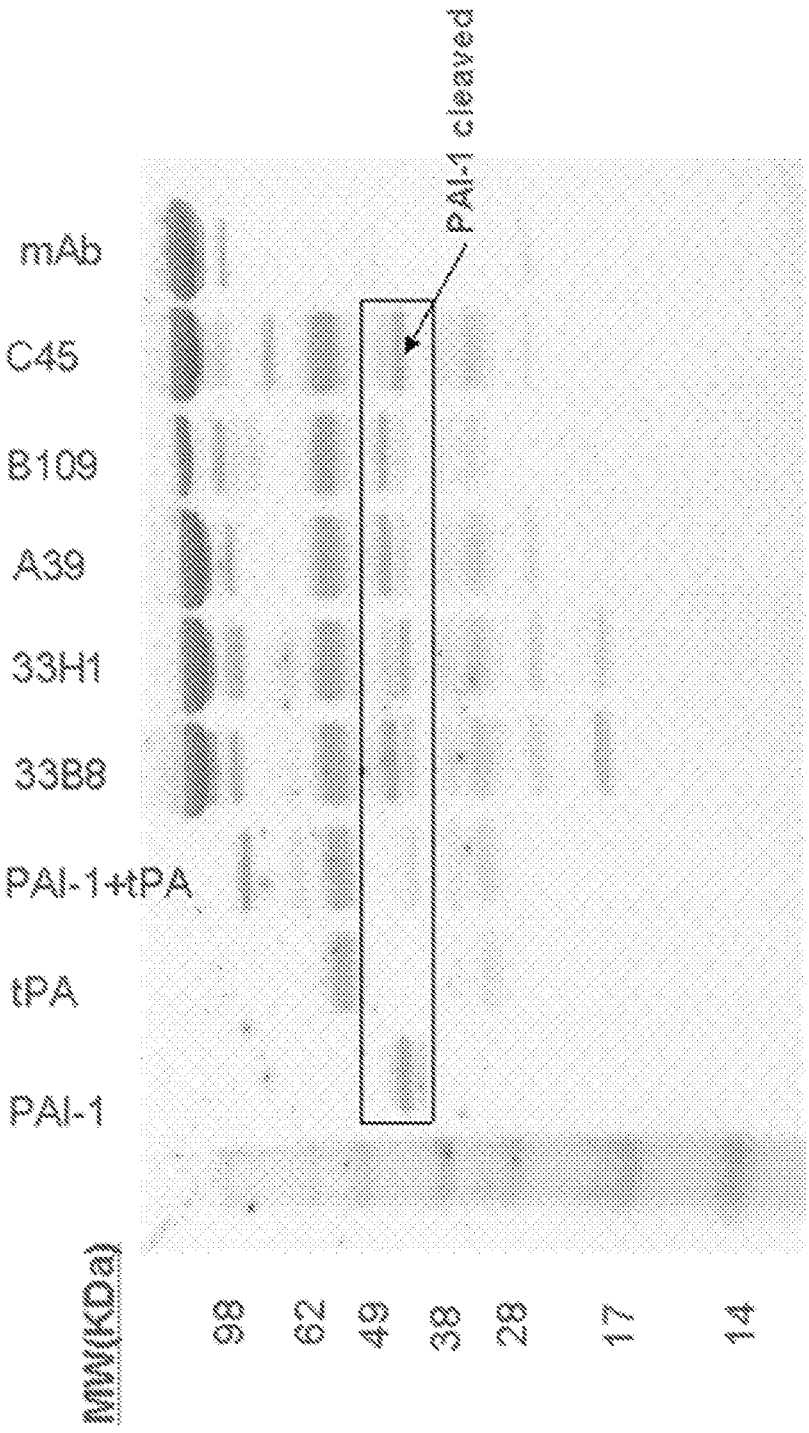

PAI-1 cleaved
mAb
C45
B109
A39
33H1
33B8
PAI-1+tPA
tPA
PAI-1
MW(kDa)
98
62
49
38
28
17
14

FIG. 10

VL ALIGNMENT

```
A105: DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPQRLISLVSK
A39:  DIQMTHSPASLSASVGETVTITCRASENIY-----SYLAWYHQKQGKSPQLLVYNAKT
A44:  DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWLQQKPGKSPKTLIYRAN
A71:  DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLYWLLQRPGQSPKRLIYLVSK
A75:  DVVMTQTPLTLSVTIGQPASI-CKSSQSLLDSEGKTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVCK
B109: DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSIPCKASQDVS-----SAVAWYQQKLGQSPKLLIYSASF
B28:  DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVY-----SYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKT
C45:  DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
E16:  DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVS-----TAVGWYQQEPGQSPKLLIYSASN
E21:  DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS-----NYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR

A105: LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLSRVEGADLGVYYCWQDRHFPRTFGGGTKLEIKRAD
A39:  LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNIKSLQPEDFGTFYCQHRYGSPWTFGGGTKLEIKRAD
A44:  SVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPPTFGGGTKLEIKRAD
A71:  LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPRTFGGGTKLEIKRAD
A75:  LDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEGEDLGVYYCWQGSHFPQTFGGGTKLEIKRAD
B109: RYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPYTFGGGTNLEIKRAD
B28:  LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLQPEDFGSYYCQHHYGTPPTFGGGTKVEIKRAD
C45:  LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRTFGGGTKLEIK---
E16:  RHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPWTFGGGTKLEIK---
E21:  LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK----
```

FIG. 11

```
VH ALIGNMENT
A105: QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWVKQRPGL----------------------GLEWIGEILPGSGST
A39:  QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQWVKQRPGH----------------------GLEWIGEILPGSN-T
A44:  EMQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSMTNGYWNWIRKFPGN----------------------KLEYMGYIT-YSGST
A71:  QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQRPGH----------------------GLDWIGEILPGSGNT
A75:  QFQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIAWLKQRPGH----------------------GLEWIAEILPGSGLT
B109: EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDT
B28:  QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQRPGL----------------------GLEWIGNILPGSGGA
C45:  QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPGQ----------------------GLEWIGVIHPGSGVT
E16:  EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQTPEK----------------------GLGWVASLRTGGN-T
E21:  EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQ----------------------GLEWIGWIDPENGDT

A105: NYNEKFKGKATFTADTSSNTAFMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYDLDYWGQGTILTVSSAKTTPP
A39:  NYNEKFKDKATFTADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGI-GLRGALDYWGQGTSVTVSSAKTTPP
A44:  YYNPSLKGRISITRNTSKNQYYLQLSSVTTEDTATYYCARWHY-GSPYYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP
A71:  NYNEKFKGKATFTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYNLDSWGQGTTLTVSSAKTTPP
A75:  NYNEIFRGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAP
B109: TYNQKFEDKAKLTAVASASTAYMEVSSLTNEDSAVYYCTRG--LRRWGAMDYWGQGTSVTVSSAKTTPP
B28:  NYNEKFKGKATVTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARLST-GTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP
C45:  NYNEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLPSDDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGTSVTVSS-------
E16:  YYSDSVKGRFTISRDNDRNILYLQMSSLRSEDTAVYYCARG--LRHWGYFDVWGAGTTVTVSS-------
E21:  EYDPKFQAKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCMYG---NYPYYFDYWGQGTTLTVSS-------
```

FIG. 12

Alignment of A44 LC with vk1:

```
A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
VK1: DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA
A44: ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG
VK1: ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDLATYYCQQ SYSTPPTFGQ
A44: GTKLEIK
VK1: GTKVEIK
```

Alignment of A44 LC with vlambda3:

```
A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITXKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
VL3: -SYELTQPPS VSVSPGQTAS ITXSGDKLGD KYASWYQQKP GQSPVLVIYQ
A44: ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYXLQ YDEFPPTFGG
VL3: DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEADYYXQA WDSSAVVFGG
A44: GTKLEIK
VL3: GTKLTVL
```

FIG. 13

```
Alignment of A44 HC with vh2:
A44:  EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVTGDSMT --NGYWNWIR KFPGNKLEYM
VH2:  QVTLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGVGVGWIR QPPGKALEWL
A44:  GYITYSGSTY YNPSLKGRIS ITRNTSKNQY YLQLSSVTTE DTATYYCARW
VH2:  ARIDWDDDKY YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARM
A44:  HYGSPYYFDY WGQGTTLTVSS
VH2:  GFTG-TYFDY WGQGTLVTVSS

Alignment of A44 HC with vh4:
A44:  EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TXSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGNKLEYMGY
VH4:  QVQLQESGPG LVKPSETLSL TXTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
A44:  ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL QLSSVTTEDT ATYYXARWHY
VH4:  IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYXARGDS
A44:  GSPYYFDYWG QGTTLTVSS
VH4:  SG-YYFDYWG QGTLVTVSS
```

FIG. 14

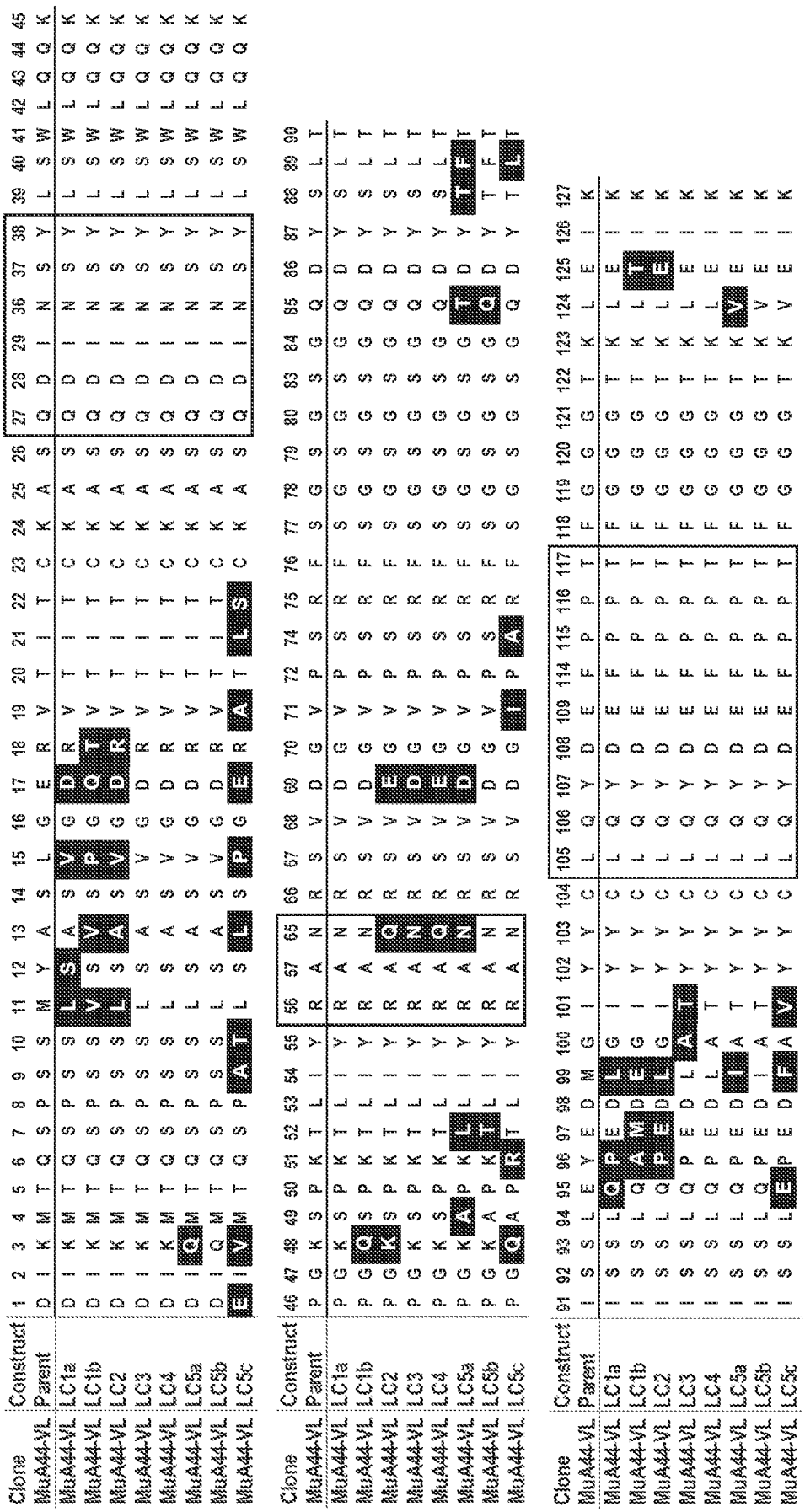


FIG. 15

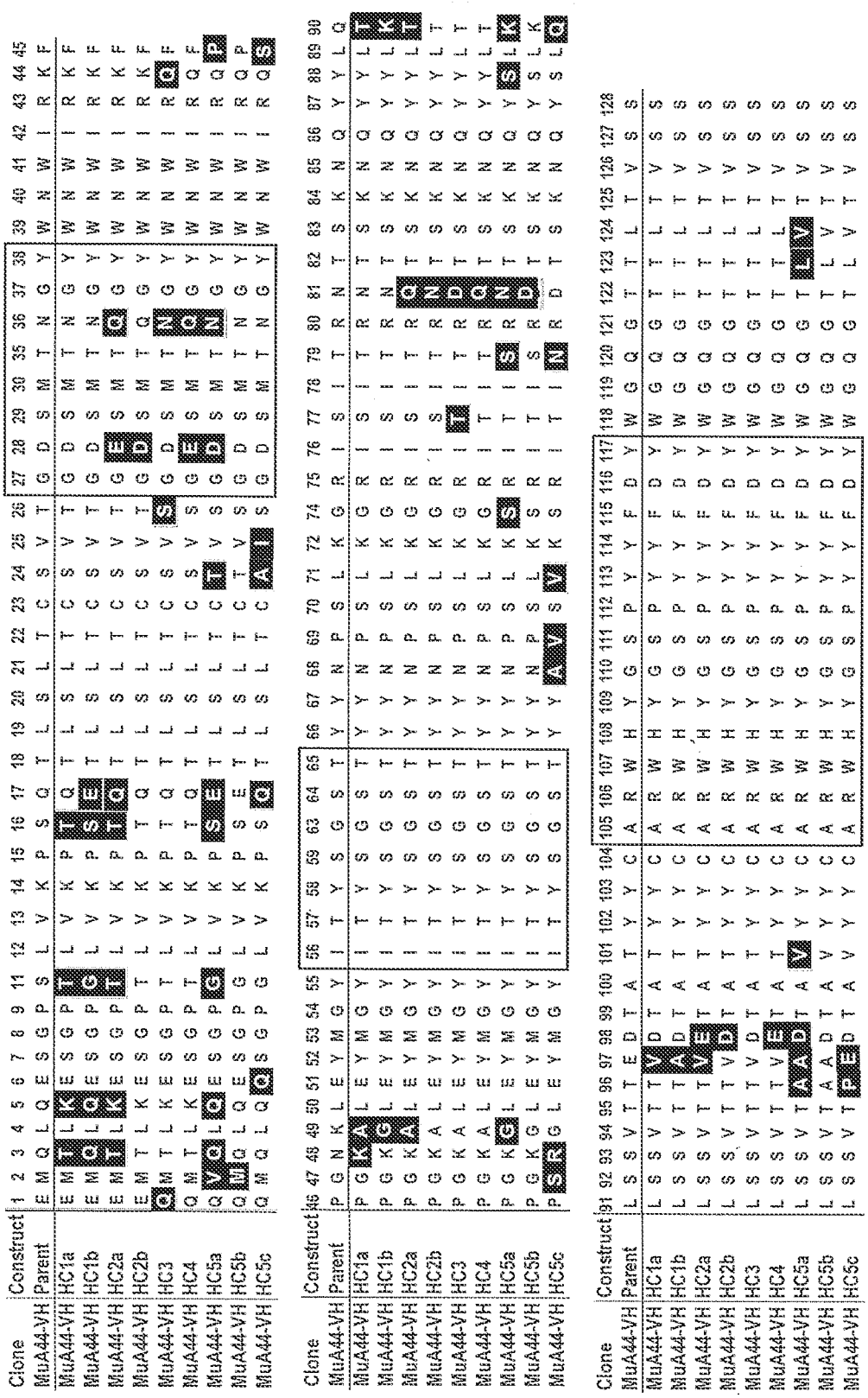


FIG. 16

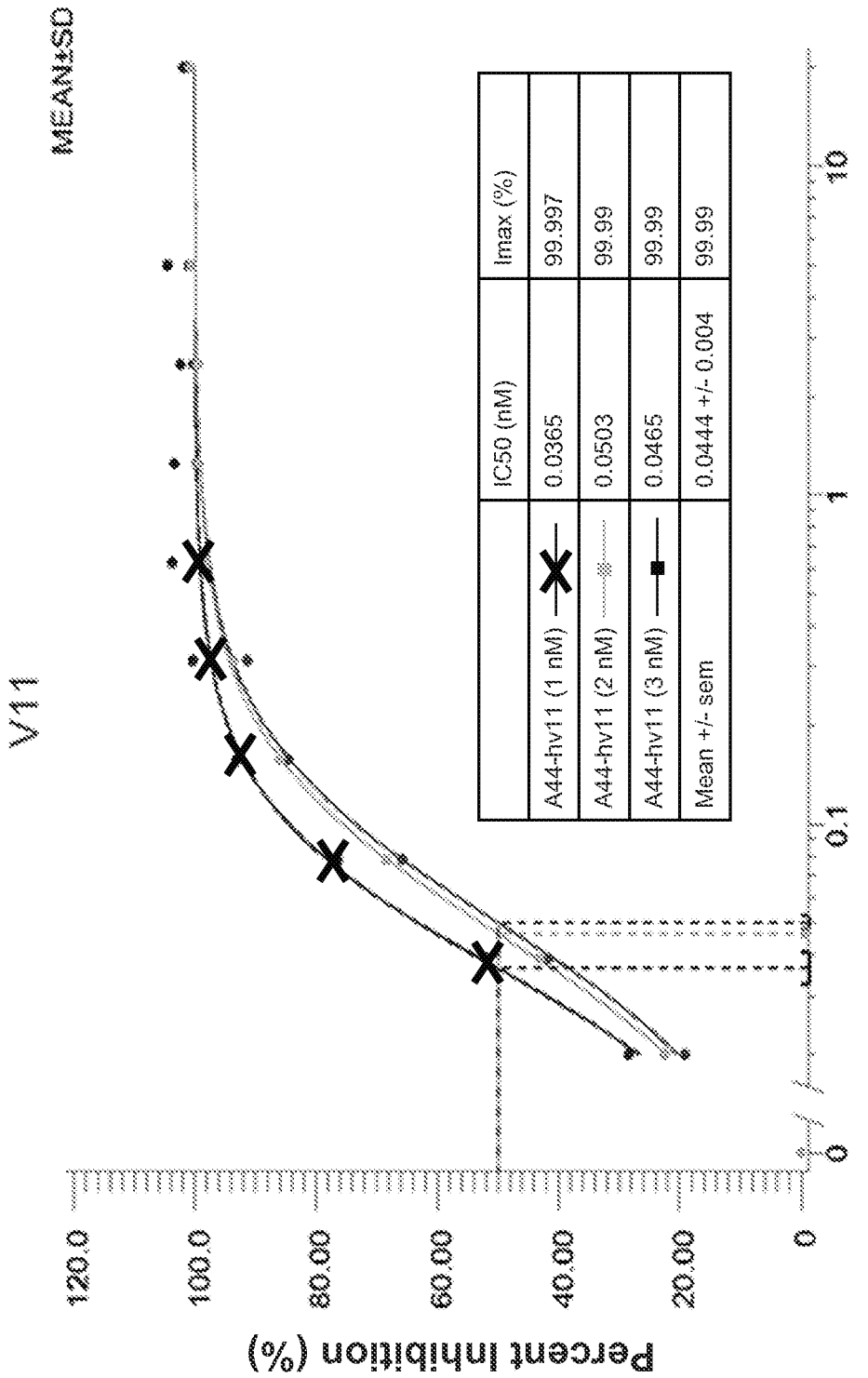

MEAN±SD
V11
Percent Inhibition (%)
120.0
100.0
80.00
60.00
40.00
20.00
0
0
0.1
1
10
IC50 (nM)
Imax (%)
A44-hv11 (1 nM)
0.0365
99.997
A44-hv11 (2 nM)
0.0503
99.99
A44-hv11 (3 nM)
0.0465
99.99
Mean +/- sem
0.0444 +/- 0.004
99.99

FIG. 17

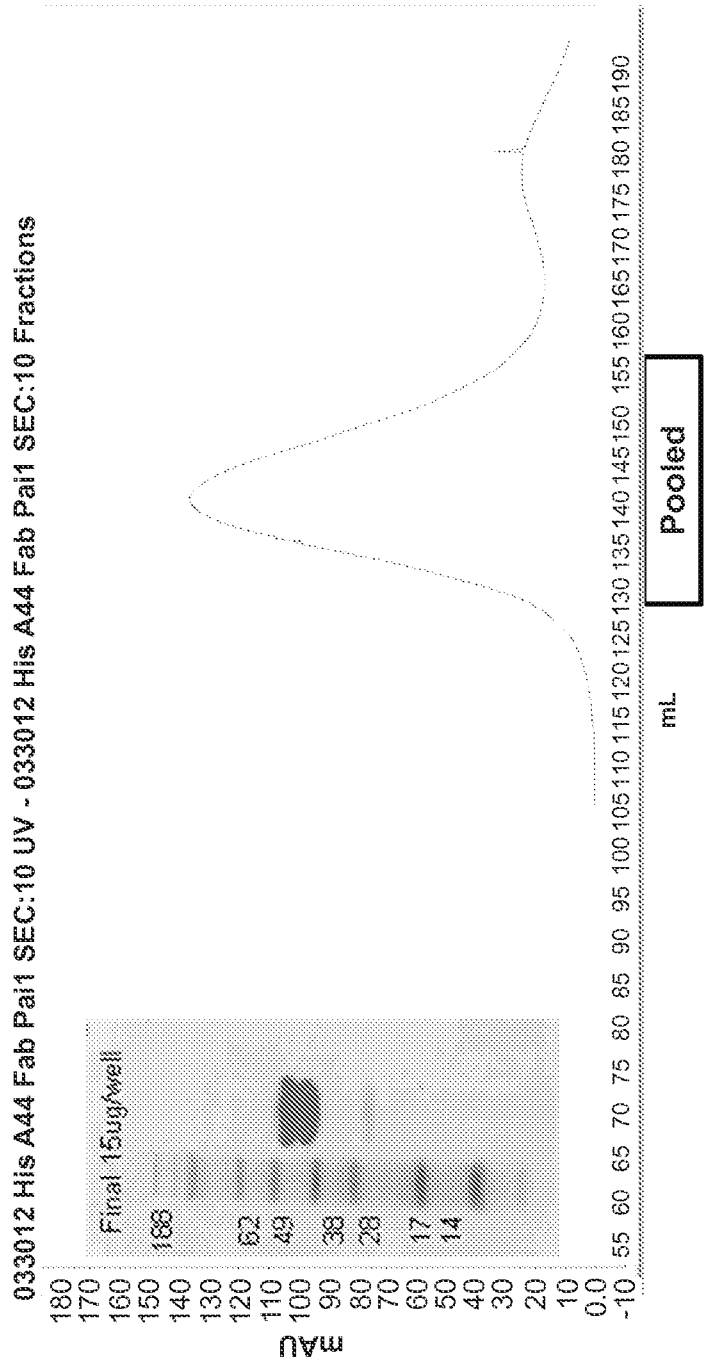

033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10 UV - 033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10 Fractions
mAU
mL
Pooled
Final 15ug/well
188
62
49
38
28
17
14

FIG. 18

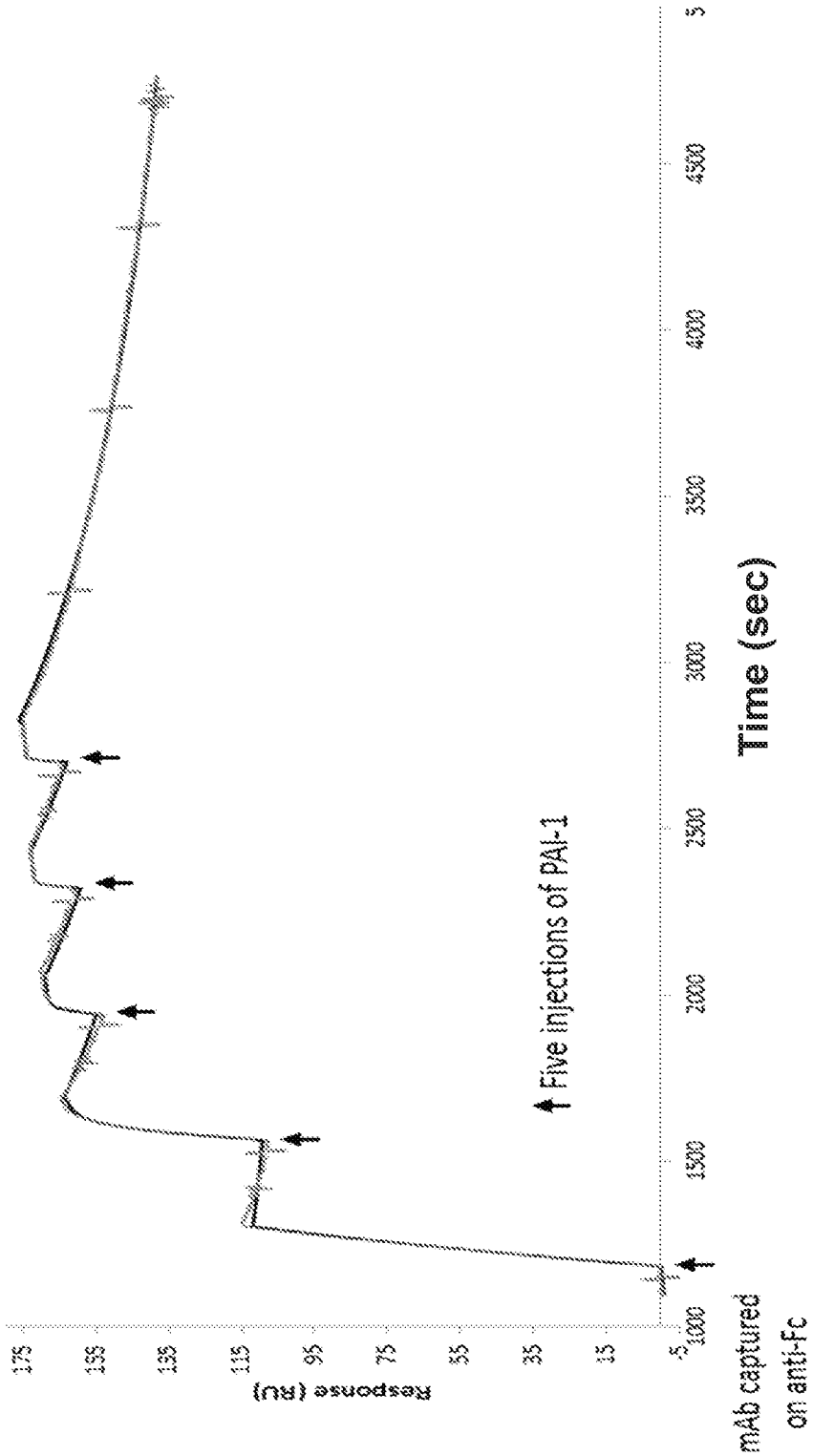

Response (Ru)
175
155
135
115
95
75
55
35
15
-5
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5
Time (sec)
Five injections of PAI-1
mAb captured on anti-Fc

FIG. 19

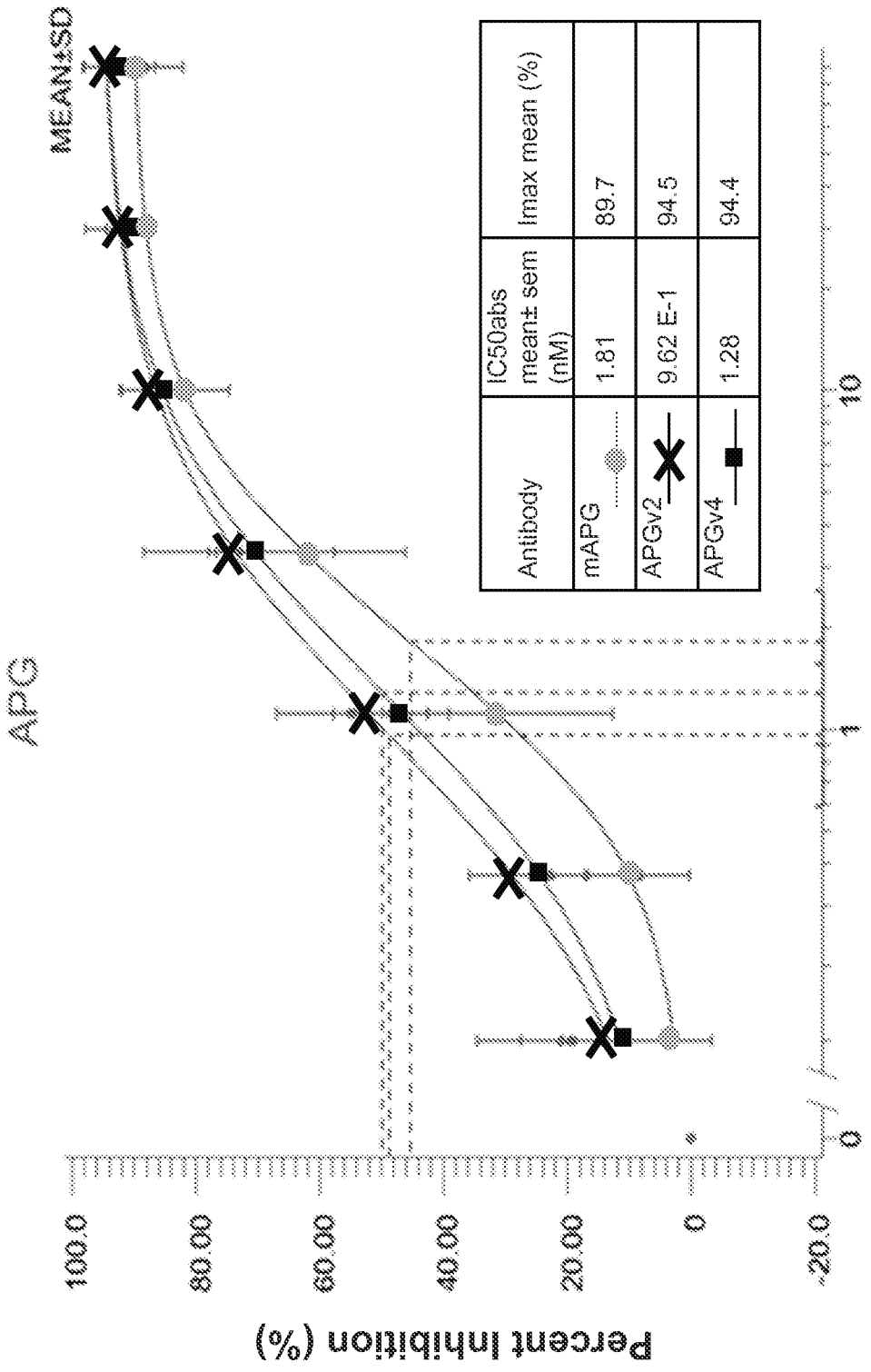

APG
MEAN±SD
Percent Inhibition (%)
100.0
80.00
60.00
40.00
20.00
0
-20.0
0
1
10
Antibody
IC50abs mean± sem (nM)
Imax mean (%)
mAPG
1.81
89.7
APGv2
9.62 E-1
94.5
APGv4
1.28
94.4

FIG. 20

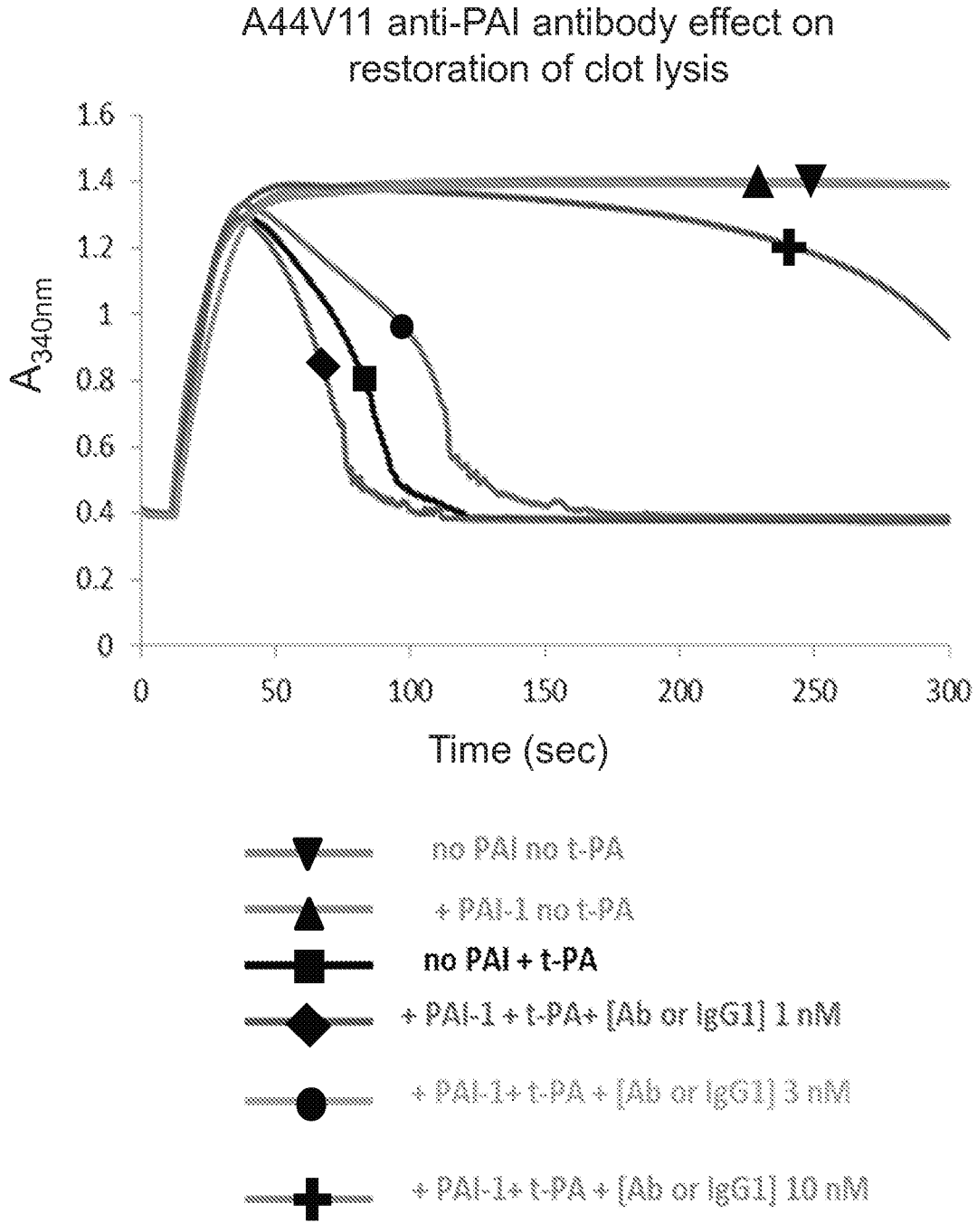

A44V11 anti-PAI antibody effect on restoration of clot lysis
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
A340nm
0
50
100
150
200
250
300
Time (sec)
no PAI no t-PA
+ PAI-1 no t-PA
no PAI + t-PA
+ PAI-1 + t-PA+ [Ab or IgG1] 1 nM
+ PAI-1+ t-PA + [Ab or IgG1] 3 nM
+ PAI-1+ t-PA + [Ab or IgG1] 10 nM

FIG. 21

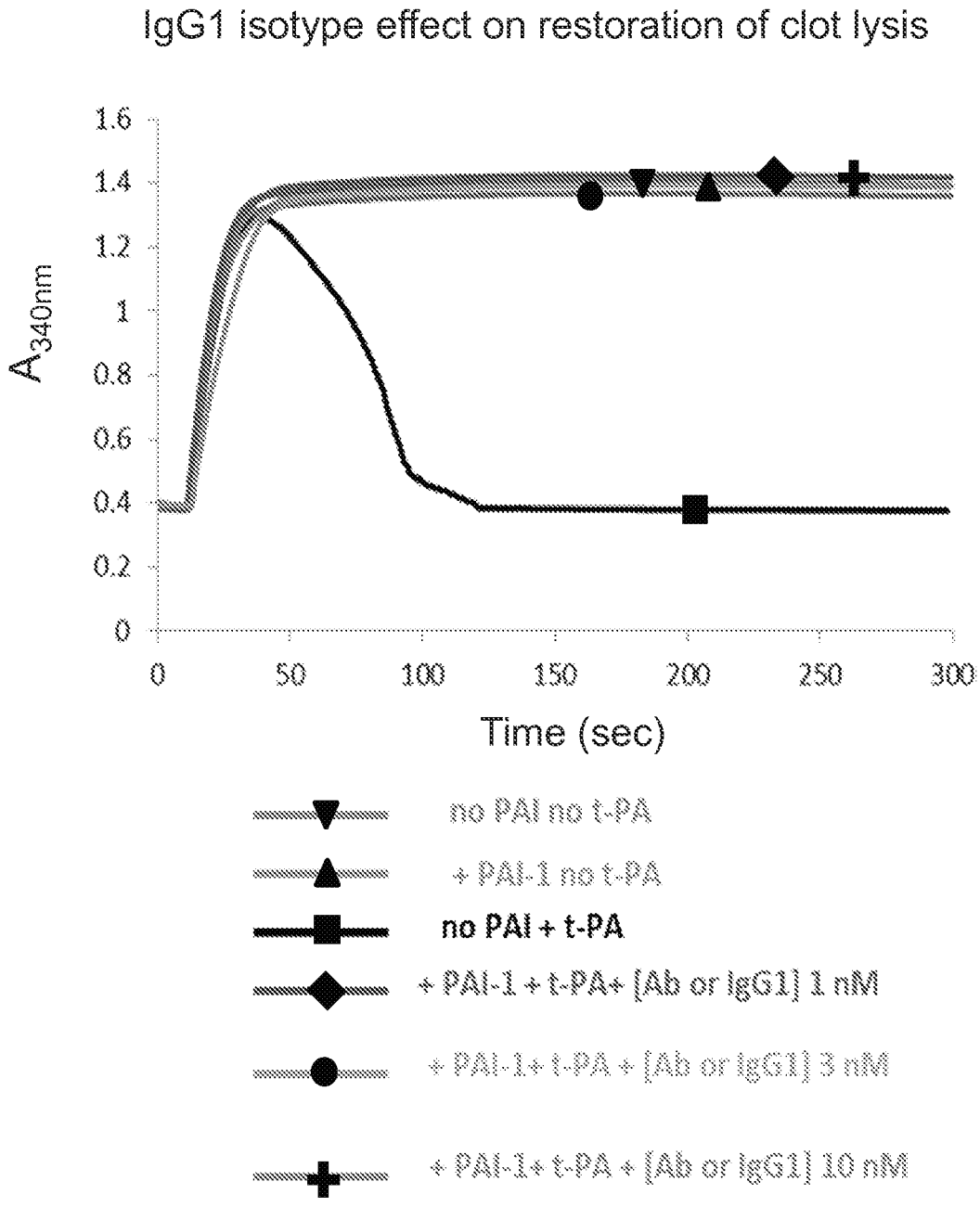

IgG1 isotype effect on restoration of clot lysis
A340nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
50
100
150
200
250
300
Time (sec)
no PAI no t-PA
+ PAI-1 no t-PA
no PAI + t-PA
+ PAI-1 + t-PA+ [Ab or IgG1] 1 nM
+ PAI-1+ t-PA + [Ab or IgG1] 3 nM
+ PAI-1+ t-PA + [Ab or IgG1] 10 nM

FIG. 22

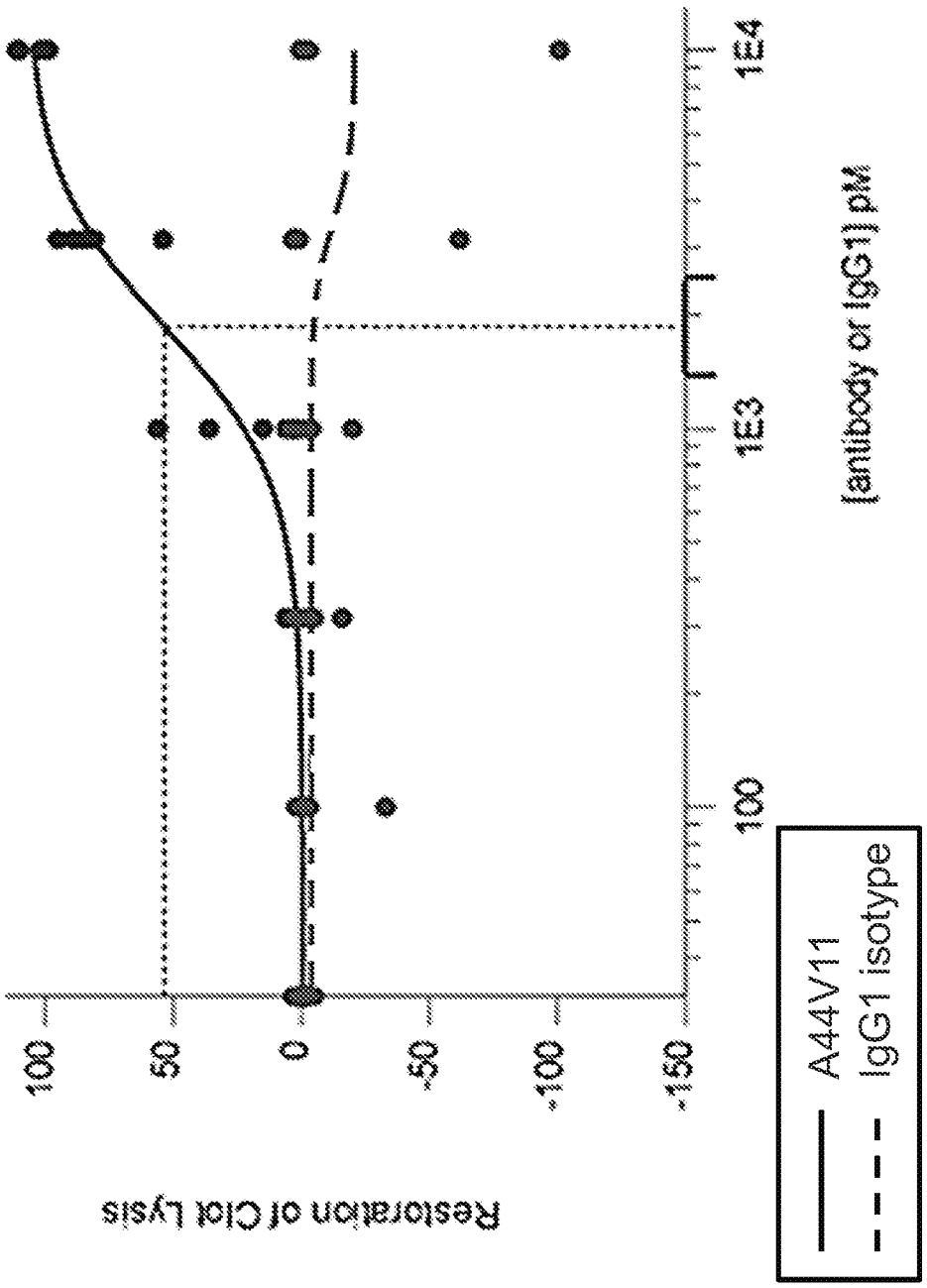

Restoration of Clot Lysis
100
50
0
-50
-100
-150
100
1E3
1E4
[antibody or IgG1] pM
A44V11
IgG1 isotype

FIG. 23

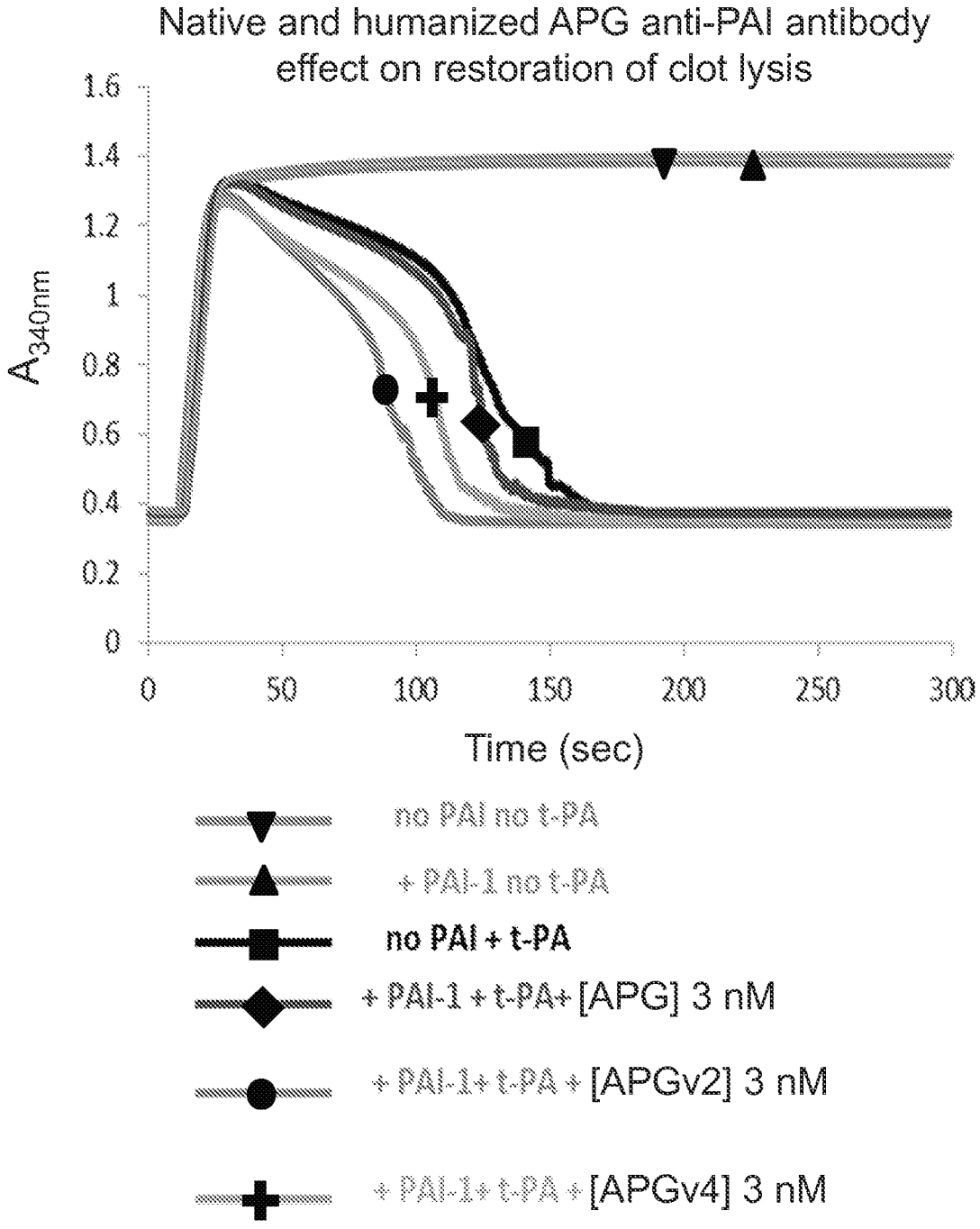

Native and humanized APG anti-PAI antibody effect on restoration of clot lysis
A340nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
50
100
150
200
250
300
Time (sec)
no PAI no t-PA
+ PAI-1 no t-PA
no PAI + t-PA
+ PAI-1 + t-PA+ [APG] 3 nM
+ PAI-1+ t-PA + [APGv2] 3 nM
+ PAI-1+ t-PA + [APGv4] 3 nM

FIG. 24

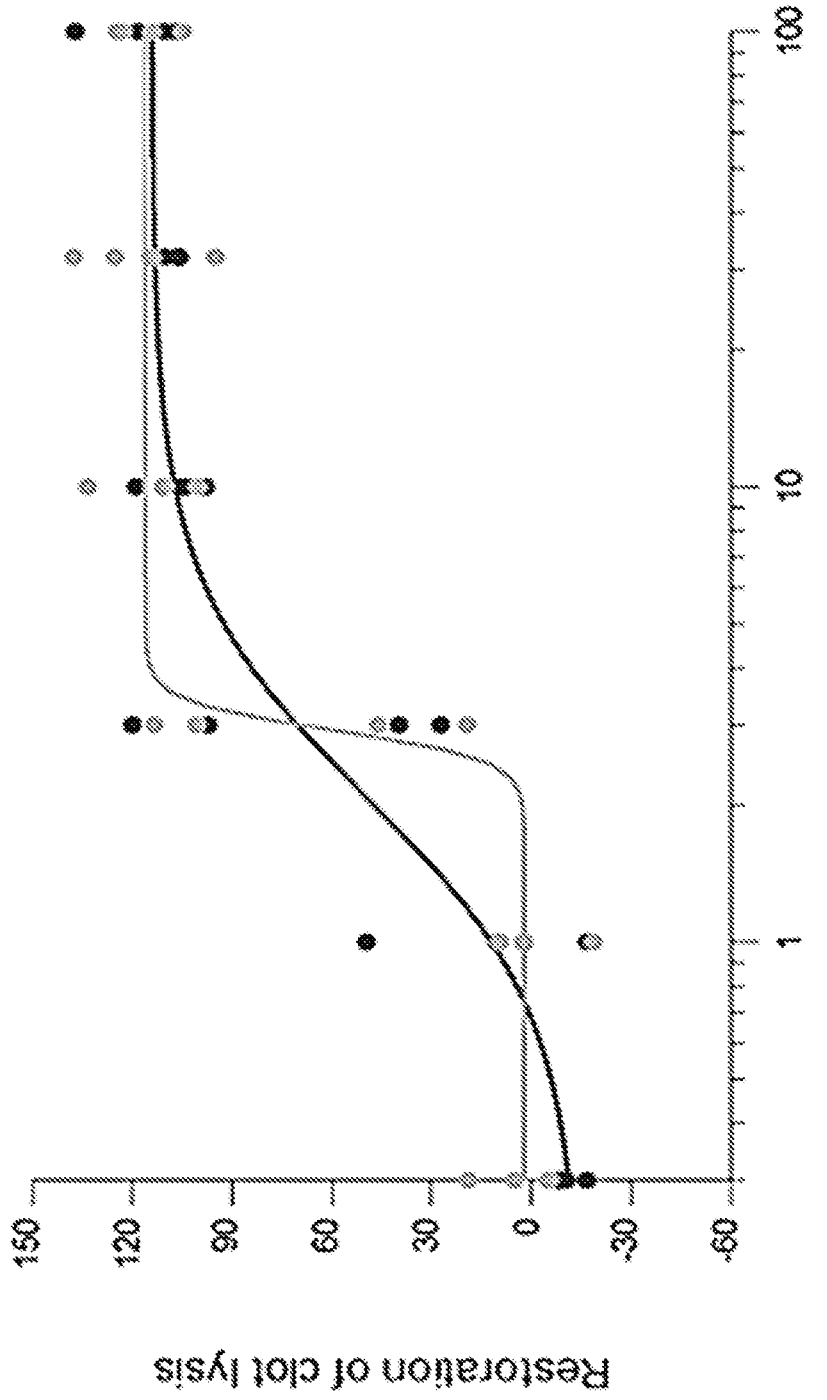

Restoration of clot lysis
150
120
90
60
30
0
-30
-60
1
10
100
[Antibody] nM
APG V2
APGV4

FIG. 25

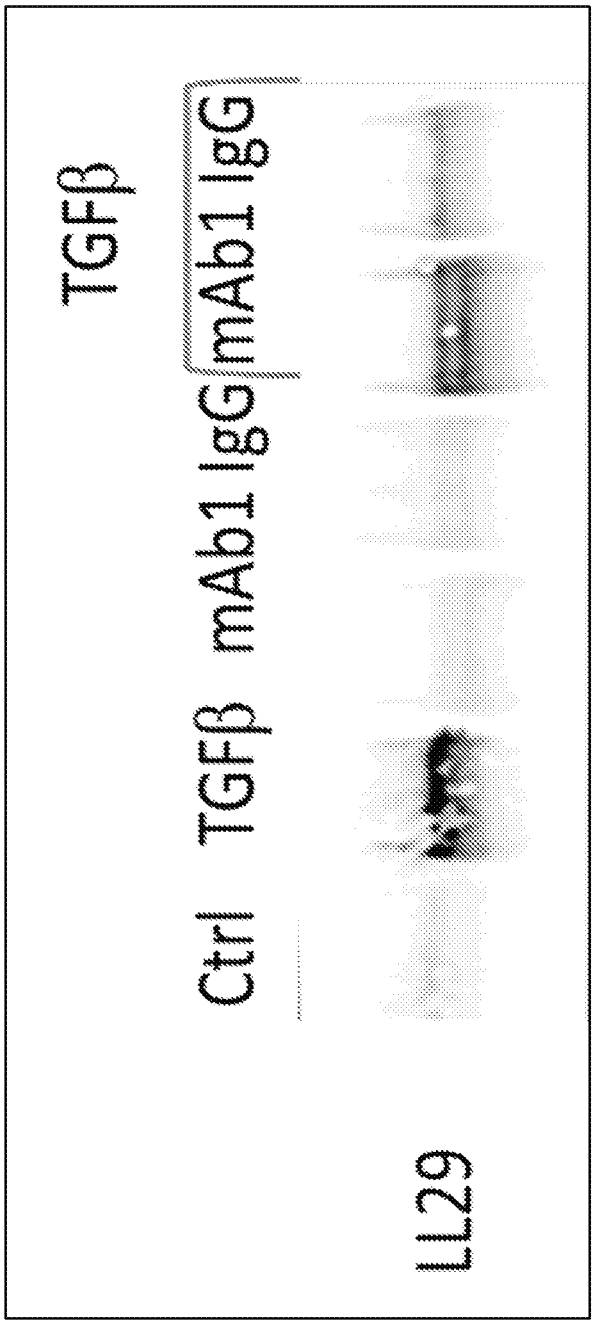


FIG. 26

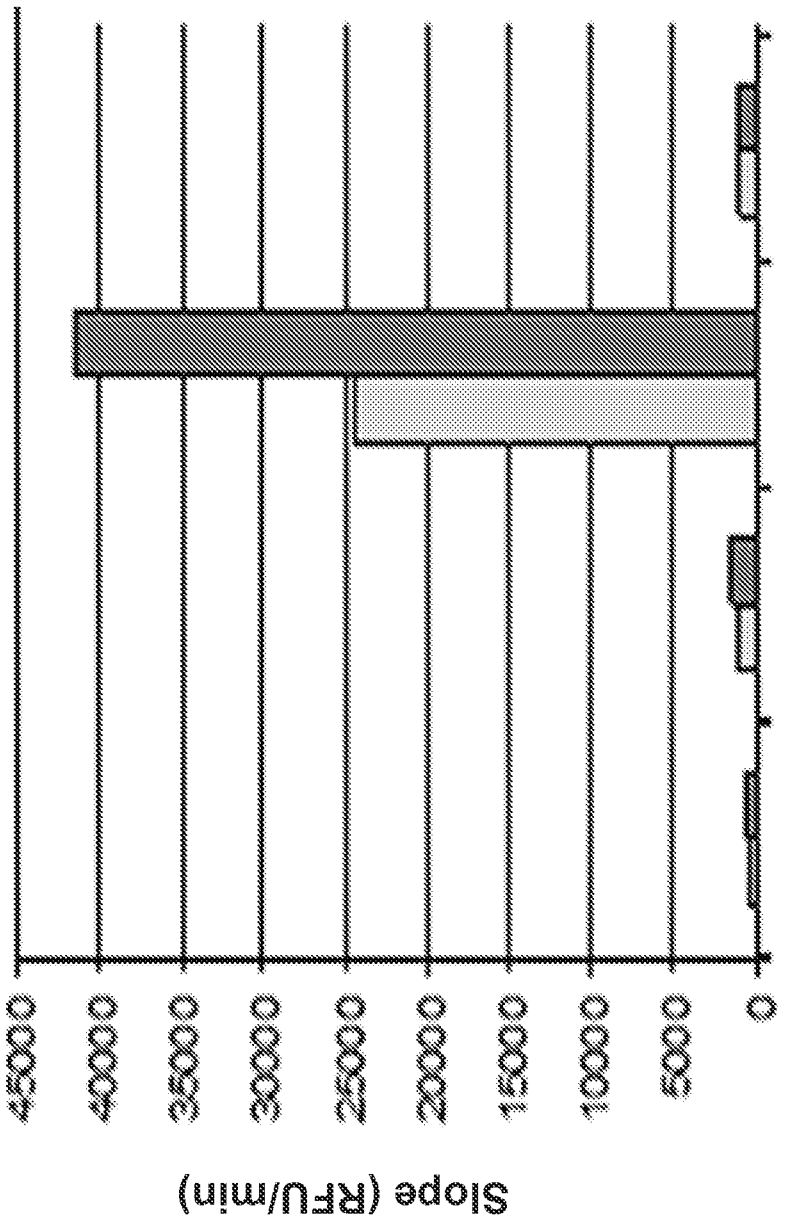

Slope (RFU/min)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Control
Pg
A+Pg
Neg+Pg
Supernatant treatments

FIG. 27

Genes encoding the anti-PAI-1 antibodies, or fragments thereof, disclosed herein can also be expressed non-mammalian cells such as bacteria or yeast or plant cells. In this regard it will be appreciated that various unicellular non-mammalian microorganisms such as bacteria can also be transformed; i.e. those capable of being grown in cultures or fermentation. Bacteria, which are susceptible to transformation, include members of the enterobacteriaceae, such as strains of Escherichia coli or Salmonella; Bacillaceae, such as Bacillus subtilis; Pneumococcus; Streptococcus, and Haemophilus influenzae. It will further be appreciated that, when expressed in bacteria, the polypeptides can become part of inclusion bodies. The polypeptides must be isolated, purified and then assembled into functional molecules.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes may also be used. Saccharomyces cerevisiae, or common baker's yeast, is the most commonly used among eukaryotic microorganisms although a number of other strains are commonly available. For expression in Saccharomyces, the plasmid YRp7, for example, (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)) is commonly used. This plasmid already contains the TRP1 gene which provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example ATCC No. 44076 or PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). The presence of the trp1 lesion as a characteristic of the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan.

V. Pharmaceutical Formulations and Methods of Administration of Anti-PAI-1 Antibodies.

In another aspect, the invention provides pharmaceutical compositions comprising an anti-PAI-1 antibody, or fragment thereof.

Methods of preparing and administering antibodies, or fragments thereof, disclosed herein to a subject are well known to or are readily determined by those skilled in the art. The route of administration of the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein may be oral, parenteral, by inhalation or topical. The term parenteral as used herein includes intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, rectal or vaginal administration. The intravenous, intraarterial, subcutaneous and intramuscular forms of parenteral administration can be used in certain embodiments. While all these forms of administration are clearly contemplated as being within the scope disclosed herein , a form for administration would be a solution for injection, in particular for intravenous or intraarterial injection or drip. Usually, a suitable pharmaceutical composition for injection may comprise a buffer (e.g. acetate, phosphate or citrate buffer), a surfactant (*e.g.* polysorbate), optionally a stabilizer agent (*e.g.* human albumin), etc. However, in other methods compatible with the teachings herein, the polypeptides can be delivered directly to the site of the

adverse cellular population thereby increasing the exposure of the diseased tissue to the therapeutic agent.

Preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. In the subject invention, pharmaceutically acceptable carriers include, but are not limited to, 0.01-0.1M (e.g. 0.05M) phosphate buffer or 0.8% saline. Other common parenteral vehicles include sodium phosphate solutions, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers, such as those based on Ringer's dextrose, and the like. Preservatives and other additives may also be present such as for example, antimicrobials, antioxidants, chelating agents, and inert gases and the like. More particularly, pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In such cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It should be stable under the conditions of manufacture and storage and will in an embodiment be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g., glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal and the like. In certain embodiments, isotonic agents are included, for example, sugars, polyalcohols, such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

In any case, sterile injectable solutions can be prepared by incorporating an active compound (e.g., an antibody by itself or in combination with other active agents) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated herein, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle, which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the methods of preparation can be vacuum drying and freeze-drying, which yields a powder

of an active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The preparations for injections are processed, filled into containers such as ampoules, bags, bottles, syringes or vials, and sealed under aseptic conditions according to methods known in the art. Further, the preparations may be packaged and sold in the form of a kit such as those described in co-pending U.S. Ser. No. 09/259,337 and U.S. Ser. No. 09/259,338 each of which is incorporated herein by reference. Such articles of manufacture will in an embodiment have labels or package inserts indicating that the associated compositions are useful for treating a subject suffering from, or predisposed to autoimmune or neoplastic disorders.

Effective doses of the stabilized antibodies, or fragments thereof, disclosed herein , for the treatment of the above described conditions vary depending upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, whether the patient is human or an animal, other medications administered, and whether treatment is prophylactic or therapeutic. Usually, the patient is a human, but non-human mammals including transgenic mammals can also be treated. Treatment dosages may be titrated using routine methods known to those of skill in the art to optimize safety and efficacy.

For passive immunization with an antibody disclosed herein , the dosage may range, e.g., from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg (e.g., 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), of the host body weight. For example dosages can be 1 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg, or in particular embodiments at least 1 mg/kg. Doses intermediate in the above ranges are also intended to be within the scope disclosed herein .

Subjects can be administered such doses daily, on alternative days, weekly or according to any other schedule determined by empirical analysis. An exemplary treatment entails administration in multiple dosages over a prolonged period, for example, of at least six months. Additional exemplary treatment regimens entail administration once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months. Exemplary dosage schedules include 1-10 mg/kg or 15 mg/kg on consecutive days, 30 mg/kg on alternate days or 60 mg/kg weekly. In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered may fall within the ranges indicated.

Antibodies or fragments thereof, disclosed herein can be administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be, e.g., daily, weekly, monthly or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of polypeptide or target molecule in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a certain plasma antibody or toxin concentration, e.g., 1-1000 ug/ml or 25-300 ug/ml. Alternatively, antibodies, or fragments thereof, can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and

frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, humanized antibodies show the longest half-life, followed by chimeric antibodies and nonhuman antibodies. In one embodiment, the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein can be administered in unconjugated form. In another embodiment, the antibodies disclosed herein can be administered multiple times in conjugated form. In still another embodiment, the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein can be administered in unconjugated form, then in conjugated form, or vice versa.

The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, compositions containing the present antibodies or a cocktail thereof are administered to a patient not already in the disease state to enhance the patient's resistance. Such an amount is defined to be a "prophylactic effective dose." In this use, the precise amounts again depend upon the patient's state of health and general immunity, but generally range from 0.1 to 25 mg per dose, especially 0.5 to 2.5 mg per dose. A relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives.

In therapeutic applications, a relatively high dosage (e.g., from about 1 to 400 mg/kg of antibody per dose, with dosages of from 5 to 25 mg being more commonly used for radioimmunoconjugates and higher doses for cytotoxin-drug conjugated molecules) at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and, in particular embodiments, until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime.

In one embodiment, a subject can be treated with a nucleic acid molecule encoding a polypeptide disclosed herein (e.g., in a vector). Doses for nucleic acids encoding polypeptides range from about 10 ng to 1 g, 100 ng to 100 mg, 1 ug to 10 mg, or 30-300 ug DNA per patient. Doses for infectious viral vectors vary from 10-100, or more, virions per dose.

Therapeutic agents can be administered by parenteral, topical, intravenous, oral, subcutaneous, intraarterial, intracranial, intraperitoneal, intranasal or intramuscular means for prophylactic or therapeutic treatment. Intramuscular injection or intravenous infusion can be used for administration of an antibody disclosed herein . In some methods, therapeutic antibodies, or fragments thereof, are injected directly into the cranium. In some methods, antibodies, or fragments thereof, are administered as a sustained release composition or device, such as a Medipad™ device.

Agents disclosed herein can optionally be administered in combination with other agents that are effective in treating the disorder or condition in need of treatment (e.g., prophylactic or therapeutic). Additional agents are those which are art recognized and are routinely administered for a particular disorder.

Effective single treatment dosages (i.e., therapeutically effective amounts) of 90Y-labeled antibodies disclosed herein range from between about 5 and about 75 mCi, and in an embodiment between about 10 and about 40 mCi. Effective single treatment non-marrow ablative dosages of 131I-labeled antibodies range from between about 5 and about 70 mCi, and in an embodiment between about 5 and about 40 mCi. Effective single treatment ablative dosages (i.e., may require autologous bone marrow transplantation) of 131I-labeled antibodies range from between about 30 and about 600 mCi, and in an embodiment between about 50 and less than about 500 mCi. In conjunction with a chimeric modified antibody, owing to the longer circulating half-life vis-a-vis murine antibodies, an effective single treatment non-marrow ablative dosages of iodine-131 labeled chimeric antibodies range from between about 5 and about 40 mCi, and in an embodiment, less than about 30 mCi. Imaging criteria for, e.g., the 111In label, are typically less than about 5 mCi.

While a great deal of clinical experience has been gained with 131I and 90Y, other radiolabels are known in the art and have been used for similar purposes. Still other radioisotopes are used for imaging. For example, additional radioisotopes which are compatible with the scope of the instant invention include, but are not limited to, 123I, 125I, 32P, 57Co, 64Cu, 67Cu, 77Br, 81Rb, 81Kr, 87Sr, 113In, 127Cs, 129Cs, 132I, 197Hg, 203Pb, 206Bi, 177Lu, 186Re, 212Pb, 212Bi, 47Sc, 105Rh, 109Pd, 153Sm, 188Re, 199Au, 225Ac, 211A 213Bi. In this respect alpha, gamma and beta emitters are all compatible with in the instant invention. Further, in view of the instant disclosure it is submitted that one skilled in the art could readily determine which radionuclides are compatible with a selected course of treatment without undue experimentation. To this end, additional radionuclides which have already been used in clinical diagnosis include 125I, 123I, 99Tc, 43K, 52Fe, 67Ga, 68Ga, as well as 111In. Antibodies have also been labeled with a variety of radionuclides for potential use in targeted immunotherapy (Peirersz *et al*. Immunol. Cell Biol. 65: 111, 1987). These radionuclides include 188Re and 186Re as well as 199Au and 67Cu to a lesser extent. U.S. Patent No. 5,460,785 provides additional data regarding such radioisotopes and is incorporated herein by reference.

As previously discussed, the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein , can be administered in a pharmaceutically effective amount for the in vivo treatment of mammalian disorders. In this regard, it will be appreciated that the disclosed antibodies, or fragments thereof, will be formulated so as to facilitate administration and promote stability of the active agent. and In certain embodiments, pharmaceutical compositions in accordance with the present invention comprise a pharmaceutically acceptable, non-toxic, sterile carrier such as physiological saline, non-toxic buffers, preservatives and the like. For the purposes of the instant application, a pharmaceutically effective amount of an antibody disclosed herein , conjugated or unconjugated to a therapeutic agent, shall be held to mean an amount sufficient to achieve effective binding to a target and to achieve a benefit, e.g., to ameliorate symptoms of a disease or disorder or to detect a substance or a cell. In the case of

tumor cells, the polypeptide will in certain embodiments be capable of interacting with selected immunoreactive antigens on neoplastic or immunoreactive cells and provide for an increase in the death of those cells. Of course, the pharmaceutical compositions disclosed herein may be administered in single or multiple doses to provide for a pharmaceutically effective amount of the polypeptide.

In keeping with the scope of the present disclosure, the antibodies disclosed herein may be administered to a human or other animal in accordance with the aforementioned methods of treatment in an amount sufficient to produce a therapeutic or prophylactic effect. The polypeptides disclosed herein can be administered to such human or other animal in a conventional dosage form prepared by combining the antibody disclosed herein with a conventional pharmaceutically acceptable carrier or diluent according to known techniques. It will be recognized by one of skill in the art that the form and character of the pharmaceutically acceptable carrier or diluent is dictated by the amount of active ingredient with which it is to be combined, the route of administration and other well-known variables. Those skilled in the art will further appreciate that a cocktail comprising one or more species of polypeptides according to the present invention may prove to be particularly effective.

VI. Methods of Treating PAI-1-Associated Disease or Disorders

The anti-PAI-1 antibodies, or fragments thereof, disclosed herein are useful for antagonizing PAI-1 activity. Accordingly, in another aspect, the invention provides methods for treating PAI-1-associated diseases or disorders by administering to a subject in need of thereof a pharmaceutical composition comprising one or more anti-PAI-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof disclosed herein .

PAI-1-associated diseases or disorders amenable to treatment include, without limitation, pathophysiologic conditions such as kidney, liver or lung fibrosis or prevention of abdominal adhesion formation.

The occurrence of intra-abdominal adhesions is a major cause of human illness. Complications of adhesions may be as serious as a life-threatening bowel obstruction, but chronic pelvic pain and infertility in women are also common sequelae to peritoneal adhesions. The majority of adhesions is induced by surgery but in some cases also has been shown to be caused by inflammation, endometriosis, chemical peritonitis, radiotherapy, foreign body reaction, and continuous ambulatory peritoneal dialysis. Peritoneal damage causes a local inflammatory response that leads to fibrin deposition. It is assumed that a posttraumatic insufficiency in peritoneal fibrinolytic activity, caused by a decrease in tissue plasminogen activator (tPA) and an increase in the plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2, permits the deposited fibrin to become organized into permanent adhesions.

Currently available and effective treatment option like Seprafilm® has limitations for use only in the open access (laparotomy) and cannot be used in the laparoscopy. The search for potential treatment is ongoing.

In certain exemplary embodiments, antibodies disclosed herein may be issued to treat renal fibrosis and associated acute kidney injury as well as chronic kidney diseases which are the main causes of end-stage renal failure.

One skilled in the art would be able, by routine experimentation, to determine what an effective, non-toxic amount of antibody (or additional therapeutic agent) would be for the purpose of treating a PAI-1-associated disease or disorder. For example, a therapeutically active amount of a polypeptide may vary according to factors such as the disease stage (e.g., stage I versus stage IV), age, sex, medical complications (e.g., immunosuppressed conditions or diseases) and weight of the subject, and the ability of the antibody to elicit a desired response in the subject. The dosage regimen may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several divided doses may be administered daily, or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. Generally, however, an effective dosage is expected to be in the range of about 0.05 to 100 milligrams per kilogram body weight per day and in an embodiment from about 0.5 to 10, milligrams per kilogram body weight per day.

The different aspects disclosed herein and their embodiments can be combined with each other. In addition, any of the aspects and their embodiments described above can be combined with any of the particular aspects and embodiments described herein below.

Some particular aspects and embodiments that further serve to illustrate the present invention are given in the following:

DESCRIPTION OF PARTICULAR ASPECTS AND EMBODIMENTS

Claim 1. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising:

(a) a heavy chain framework region and a heavy chain variable region, the heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 34, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and

(b) a light chain framework region and a light chain variable region, the light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 145, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

Claim 2. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 comprising:

(a) a heavy chain framework region and a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, and

(b) a light chain framework region and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93.

Claim 3. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 comprising:

(a) a heavy chain variable region that is at least 95% identical to the heavy chain variable region of the antibody of claim 2, and/or

(b) a light chain variable region that is at least 95% identical to the light chain variable region of the antibody of claim 2.

Claim 4. An isolated monoclonal antibody that binds to essentially the same epitope as the antibody of claim 1.

Claim 5. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising:

(a) a heavy chain framework region and a heavy chain variable region, the heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 34, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and

(b) a light chain framework region and a light chain variable region, the light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 36, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

Claim 6. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable region comprises SEQ ID NO: 6, and the light chain variable region comprises SEQ ID NO: 7.

Claim 7. An isolated monoclonal antibody that binds to essentially the same epitope as the antibody of claim 5.

Claim 8. A humanized monoclonal antibody that binds specifically to human PAI-1, wherein the antibody comprises:

(a) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 82, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 91, or an antigen-binding fragment thereof;

(b) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 83, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 92, or an antigen-binding fragment thereof;

(c) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 84, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof;

(d) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 85, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 91, or an antigen-binding fragment thereof;

(e) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 85, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof;

(f) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 94, or an antigen-binding fragment thereof;

(g) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 87, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof;

(h) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 88, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 96, or an antigen-binding fragment thereof;

(i) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 97, or an antigen-binding fragment thereof;

(j) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 90, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 98, or an antigen-binding fragment thereof;

(l) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof;

(m) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof; or

(n) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof.

Claim 9. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising

(a) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 22, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 21, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 20; and a light chain variable region comprising a light

chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 25, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 24, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 23,

(b) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 28, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 27, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 26; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 31, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 30, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 29,

(c) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 40, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 39, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 38; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 43, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 42, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 41,

(d) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 46, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 45, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 44; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 49, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 48, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 47,

(e) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 52, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 51, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 50; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 55, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 54, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 53,

(f) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 58, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 57, and heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 56; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 61, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 60, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 59,

(g) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 64, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 63, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 62; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 67, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 66, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 65,

(h) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 70, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 69, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 68; and a light chain variable region comprising a light

chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 73, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 72, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 71; or

(i) a heavy chain variable region comprising a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 76, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 75, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 74; and a light chain variable region comprising a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 79, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 78, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 77.

Claim 10. An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, that binds to essentially the same epitope on PAI-1 as the humanized monoclonal antibody of claim 8 or claim 9.

Claim 11. A method of restoring plasmin generation comprising administering to a subject in need thereof orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody.

Claim 12. The method of claim 11, wherein the method treats a condition comprising increased levels of fibrotic tissue.

Claim 13. The method of claim 12, wherein the condition is fibrosis, skin fibrosis, systemic sclerosis, lung fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, interstitial lung disease, chronic lung disease, liver fibrosis, kidney fibrosis, chronic kidney disease, thrombosis, venous and arterial thrombosis, deep vein thrombosis, peripheral limb ischemia, disseminated intravascular coagulation thrombosis, acute ischemic stroke with and without thrombolysis, or stent restenosis.

Claim 14. The method of claim 11, 12, or 13 wherein the PAI-1 antibody comprises the antibody of any of the preceding claims.

Claim 15. Use of a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody for the manufacture of a medicament for treating a condition caused by increased levels of PAI-1 or increased sensitivity to PAI-1, comprising administering to a patient orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically.

EXAMPLES

The present invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as further limiting. The contents of Sequence Listing, Figures and all references, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

Furthermore, in accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, *e.g.*, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular*

Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach,* Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J.Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Example 1: Hybridoma Generation: Immunization of Mice with PAI-1 Protein and Antibody Generation

Antibodies were developed that would be cross-reactive to human (h) and cynomolgus (cyno) monkey active PAI-1 (glycosylated or non-glycosylated form) and that would neutralize the inhibitory activity of PAI-1 and restore downstream production of plasmin thereby being an effective therapeutic for treatment of kidney, liver or lung fibrosis or prevention of abdominal adhesion formation and keloid scar formation. Neutralization of PAI-1 inhibitory function by monoclonal antibodies has been described to fall under three mechanisms: (1) blocking PAI-1 to tPA or uPA by steric hindrance, (2) converting PAI-1 into a latent conformation, or (3) converting PAI-1 into a substrate conformation.

a) Antigens

PAI-1 is secreted from the cells in an active conformation stabilized by its binding with subnanomolar affinity to vitronectin. PAI-1 undergoes spontaneous conformational change from active conformation into a latent conformation within minutes at 37°C and within hours at room temperature. Once bound to vitronectin, PAI-1 becomes more resistant to the conformational change which prolongs the half-life of PAI-1 in active conformation from minutes to hours. To extend active conformation PAI-1 half-life in the immunized animals and to allow the mouse immune system to recognize the active PAI-1 conformation, a complex of vitronectin and PAI-1 was used for immunizations.

Human glycosylated PAI-1 produced in insect cells was purchased from Innovative Research (Cat# IGLYHPAI-A). Vitronectin (Cat# IHVN) and tPA (Cat# HTPA-TC) were also purchased from Innovative Research. To produce immunogens PAI-1 was incubated with vitronectin at a 1:1 molar ratio for 1 hour at room temperature, or with tPA at a 1:1 molar ratio for 15 minutes at 37°C. All immunogens were prepared using sterile saline as diluent.

b) Immunizations

Standard hybridoma production protocols known in the art were implemented to produce antibodies. Standard approaches previously described in the literature used PAI-1 only or PAI-1/tPA complex. The inventors instead generated antibodies against the active conformation of PAI-1. PAI-1/vitronectin complex was used as a novel approach to generating antibodies to PAI-1. A three-prong strategy, outlined below, was taken to generate antibodies:

(1) Classical immunization of mice with PAI-1/vitronectin complex to obtain mouse splenocytes for fusion with mouse myeloma cell line as a fusion partner to produce hybridoma;

(2) Classical immunization of mice with PAI-1/ tPA complex to obtain mouse splenocytes for fusion with mouse myeloma cell line as a fusion partner to produce hybridoma; and

(3) Classical immunization of mice with PAI-1 only to obtain mouse splenocytes for fusion with mouse myeloma cell line as a fusion partner to produce hybridoma.

Three mice per antigen (PAI-1 only, Vn/PAI-1 complex, tPA/PAI-1 complex) were used in the study. The mice were 9-20 week-old naïve female BALB/c Mice (Charles River, strain code 028). On day 0, nine mice were immunized intraperitoneally with PAI-1 alone, Vn/PAI-1 or tPA/PAI-1 complexes in phosphate-buffered saline (PBS). A total of 10 ug of antigen per mouse was mixed at 1:1 volume to volume ratio of Sigma Adjuvant System (Sigma cat #6322) in a total volume of 200 µl per mouse. On day 14, mice were boosted with the same amount of antigen and prepared the same way as on day 0. On day 21, blood samples were collected for PAI-1 specific antibody titer evaluation. Mice immunized with PAI-1/tPA complexes showed very low specific reactivity against PAI-1and high anti-tPA titers and were not used for downstream fusions.

On day 51, the mouse with the highest anti-PAI-1 specific antibody titer and the lowest titer against the protein that PAI-1 was complexed to (i.e., either Vn or tPA) while those having the highest titer against mouse and rat PAI-1 orthologs were selected for fusion. The mice selected for fusion were boosted with PAI-1 only or PAI-1/ Vn complex in PBS as an antigen total of 10 ug per mouse mixed at 1:1 ratio of Sigma Adjuvant System (Sigma cat #6322) in a total volume of 200 µl per mouse as described above. At day 55 mice were sacrificed by CO_2 chamber, blood was collected through the cardiac puncture and spleen was harvested for hybridoma production. The other four mice underwent the same procedure at later times (2-4 months after the first mouse was used for fusion).

Serum titrations were performed on three mice for PAI-1 only and PAI-1/tPA and two mice for PAI-1/Vn using the ELISA protocol described in Example 2 (Binding ELISA).

Table 3: Serum Titers for Mouse Immunized with PAI-1, PAI-1/Vn or PAI-1/tPA

	Serum Titer Against PAI-1 (OD_{405})

Immunogen	Mouse #	OD 1:100	OD 1:1000	OD 1:10000
PAI-1	1	2.1	1.9	1
PAI-1	2	2.1	1.4	1
PAI-1	3	2.0	1.4	1
PAI-1/Vn	2	2.15	1.5	1
PAI-1/Vn	3	1.7	1.25	1
PAI-1/tPA	1	1.2	0.8	0.3
PAI-1/tPA	2	1.3	0.9	0.7
PAI-1/tPA	3	1.3	0.9	0.5
NMS	n/a	0.4	0.12	0.07
NMS=normal mouse serum; n/a=not applicable OD_{405} using BioTek Synergy HT instrument				

The mice immunized with PAI-1/tPA complex did not reach high specific titer criteria and were not used for fusions (Table 3). Based on the serum titers presented in Table 3, a total of 5 mice with high specific titer against PAI-1 were selected for fusions.

b) Fusions

The five mice having the highest specific titer against PAI-1 were selected for fusions. On the day of the fusion, the mice were sacrificed in a CO_2 chamber, blood was collected through cardiac puncture and the spleens removed and placed into a Petri dish containing 10 ml of serum free Hybridoma Fusion Medium (IMDM; Iscove's Modified Dulbecco's Medium 500 ml (HyClone SH30259.01). Splenocytes were squeezed out of the fibroelastic coat by forceps and washed twice in 10 ml of serum free IMDM (including initial spin).

Cells were counted in a Countess Automated Cell Counter. Fusion partner cells (myeloma: FO (ATCC ref CRL-1646)) and splenocytes were then combined in one 50ml tube at ratio of 1:2 to 1:10 (by cell number) and spun down at 970 rpm for 10 min (slow spin) to form a loose pellet. Preheated (at 37°C) 1ml PEG (PEG 1500 in 75 mM Hepes 50% w/v, Roche cat # 783641 (10783641001) was added drop by drop to the cell pellet over 1 minute period of time and cells were mixed after every drop of PEG was added. The pellet was incubated with PEG for another 1 minute followed by addition of 10 ml of serum-free IMDM medium over 1 minute, such that the first 1 ml out of 10 is added over 30 sec. Cells underwent slow spin at 970 rpm for 10 min to preserve viability. Fused cells were plated in 96-well plates at 200ul in selection medium (200ml Gibco Hybridoma (SFM # 12045), 20ml 10% HyClone SuperLow IgG Defined FBS (# SH30898.03), 2 ml

penicillin/streptomycin, 4 ml (Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (Roche Diagnostics 11 363 735 001 (50X)) and 4 ml of HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) (Sigma-Aldrich # HO262 (50X)). Fusions were ready for screening about 10 to 14 days later, or when medium in the wells turned yellow. Supernatants from the developed hybridomas were then tested by ELISA (Example 2) for the presence of antibodies binding to PAI-1 and PAI-1/Vn complexes.

Example 2: Binding ELISA for hybridoma supernatant screening for specificity to PAI-1 – Vitronectin complex

Each fusion from the spleens of the five mice selected resulted in about 5000 clones that needed to be screened for binding to PAI-1/Vn complex as a first-step primary screen. Primary screening of the hybridoma supernatants was performed in parallel using ELISA against either PAI-1 or PAI-1-Vitronectin complexes to select hybridomas binding specifically to PAI-1 complexed to Vitronectin. The materials used for the ELISA were the following: Immulon 4 HBX ELISA plates (Dynax cat # N0541216); human monomeric Vitronectin at 5ug/ml (Innovative Research cat# IHVN); glycosylated human PAI-1 (active form) (Molecular Innovations cat# GLYHPAI-A); non-glycosylated mouse PAi-1 in some fusions (Molecular Innovations cat# MPAI-A); a secondary antibody that was HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs # 115-035-166); and, ABTS substrate: Roche Diagnostics (# 11 204 521 001).

Control antibodies used were:

a) 33B8, a mouse monoclonal inhibitory antibody against PAI-1 (IgG1; Innovative Research cat# IMA-33B8);

b) 33H1, a mouse monoclonal inhibitory antibody against PAI-1 (IgG1; Innovative Research cat# IMA-33H1);

c) 31C9, a mouse monoclonal non-inhibitory antibody against PAI-1 (IgG1; Innovative Research cat# IMA-31C9); and

d) 1B7.11, a IgG1 isotype control antibody (anti-TNP mAb – produced in-house from hybridoma cell line purchased from ATCC (Cat# TIB-191)

The ELISA method was as follows: plates coated with 5 ug/ml Vn in PBS overnight at 4°C at 50 ul/well; the next day plates were blocked 1 hour with 200ul 1% bovine serum albumin in PBS (BSA/PBS); plates were washed four times with 200 ul/well PBS; active PAI-1 at 2 ug/ml in 1% BSA/PBS was added to the plates at 50ul/well and incubated 1 hour; plates were washed four times with 200 ul/well PBS; antibody dilutions in 1%BSA/PBS or hybridoma supernatants from the original 96-well plates were added to ELISA plates at 50 ul/well; plates were incubated 1 hour at room

temperature (RT); plates were washed four times with 200 ul/well PBS; HRP-anti-mouse IgG 50ul 1:2000 in 1% BSA/PBS was added and incubated 1 hour at room temperature; plates were washed four times with 200 ul/well PBS; ABTS substrate (one pill dissolved in 5 ml) at 50ul/well was added to the plates) and then plates were read on BioTek Synergy HT instrument using OD_{405}. A typical standard curve for antibody titration in the binding ELISA is shown in Figure 2. The antibodies 31C9, 33B8 and 33H1 served as positive controls and IgG1 served as a negative control. Table 4 shows that of the about 5000 clones generated, 675 clones were positive for binding to both PAI-1 and PAI-1/Vn. These clones were then screened for PAI-1 affinity.

Table 4: Number of Clones Positive for Binding to Both PAI-1 and PAI-1/Vn

Fusion	Immunogen	Mouse #	# of Clones Positive for Binding to Both PAI-1 and PAI-1/Vn
A	PAI-1/Vn	2	131
B	PAI-1	2	146
C	PAI-1/Vn	3	145
D	PAI-1	3	104
E	PAI-1	1	149

Example 3: Biacore Screening of Hybridoma Supernatants by Affinity Ranking

Further selection of a high affinity antibody with low off-rate was performed by Biacore. Biacore hybridoma supernatant screening was performed either by: (1) reverse screening using anti-mouse immobilized anti-PAI-1 antibodies or (2) forward screening assay using free PAI-1 as a ligand or against immobilized Vn.

The instruments used were the BIACORE 2000 or BIACORE 3000 (GE Healthcare), designed for biomolecular interaction analysis (BIA) in real time. The sensor chip used was the CM5 chip (GE Healthcare) with carboxymethylated dextran matrix on the surface. Each sensor chip has four parallel flow cells (Fc). Every flow cell was coupled with anti-mouse IgG Fc mAb via standard amine coupling according to the manufacture's protocol for chip preparation.

In the Biacore reverse screening assay, ELISA positive hybridoma supernatants were selected and filtered through 0.2 μm filters before being injected onto Biacore chip surface. Each hybridoma supernatant was injected onto one flow cell of flow cells Fc2-Fc4 and the IgG in the hybridoma supernatant would be captured to the chip surface by anti-mouse IgG Fc mAb, while Fc1 was left alone as reference cells. Human PAI-1 protein in PBS was then injected to Fc1 to Fc4. PBS buffer was also injected over the chip surface as a blank. After subtracting signals of Fc1 and blank buffer

runs, the binding affinity (KD)/disassociation rate (kd) of the antibody from the supernatants to PAI-1 protein was analyzed and ranked using Scrubber 2 software.

In the Biacore forward screening assay, purified human vitronectin protein was immobilized to CM5 chip flow cells Fc1 to Fc4. Human or cyno PAI-1 were captured onto all flow cells. Filtered selected hybridoma supernatants then were injected over captured PAI-1 one per flow cell, except Fc1 which was reserved as the reference flow cell. PBS buffer was also injected over the chip surface as a blank. After subtracting signals of Fc1 and blank buffer runs, binding affinity of antibody in hybridoma supernatant to the vitronectin captured PAI-1 was analyzed and ranked using Scrubber 2 software (version 2.0a, 2005; BioLogic Software, BioLogic Software Rty Ltd., 116 Blamey Court, Campbell, ACT 2612 Australia).

Table 5 shows a selection of positive and negative antibody clones from the fusions A, B, C, D and E. Not all data was shown because of the large number of antibody clones that were screened. Only the antibody clones that demonstrated superior (kd < 10^{-4} 1/s) binding dissociation rate against human and cyno PAI-1 proteins were selected for the functional chromogenic assay.

Table 5: Hybridoma Supernatant Binding to Human PAI-1 Affinity/Off Rate Screening in Biacore Assay

	Binding to hPAI-1				Binding to hPAI-1		
CLONE	Binding	Off-rate <= 10^{-4}	cyno PAI-1	CLONE	Binding	Off-rate <= 10^{-4}	cyno PAI-1
A9	ND	ND	ND	C26	+	-	-
A20	+	-	-	C45	+	+	+/-
A37	+	-	-	C46	+	+	+
A39	+	+	-	C49	+	+/-	ND
A41	ND	ND	ND	C61	+	+/-	+/-
A44	+	+	+	C66	+	-	-
A47	+	+	+	C69	+	+	+/-
A52	ND	ND	ND	C76	ND	ND	ND
A71	+	+	+	C79	+	-	-
A75	+	+/-	+/-	C85	ND	ND	ND
A83	+	+/-	-	C109	+	-	-
A89	+	+/-	-	C118	+	+/-	ND
A93	+	+/-	-	C134	ND	ND	ND
A98	+	-	-	C145	+	-	+/-

A99	+	+	+/-	**D4**	-	-	-
A105	+	+	+	**D12**	+	-	-
A107	+	-	-	**D13**	-	-	ND
A113	+	+	+	**D15**	-	-	ND
A119	+	+/-	+/-	**D31**	+	-	-
B16	ND	ND	ND	**D33**	+	+/-	-
B18	+	-	-	**D37**	+	-	-
B28	+	+	-	**D48**	+	+	+/-
B29	+	-	-	**D52**	+	+	+
B32	+	+	+	**E4**	+	+	-
B58	+	+	-	**E5**	+	+	-
B85	ND	ND	ND	**E11**	+	+	-
B89	+	+	+/-	**E16**	+	+	+/-
B99	+	-	+/-	**E20**	+	ND	ND
B105	+	+	+/-	**E21**	+	+	-
B109	+	+	+				
B118	ND	ND	ND				

"+" = represents positive binding to h/cPAI-1 or an off-rate of less than or equal to 10^{-4}

""+/-"= represents partial binding to h/cPAI-1 or an off-rate slightly higher than to 10^{-4}

"-" = represents low or no binding to h/cPAI-1 or an off-rate higher than to 10^{-4}

ND = not determined

Example 4: Functional ELISA for Hybridoma Supernatant Screening to Select for Antibodies that Block the Interaction of PAI-1 with tPA

To allow for selection of functional antibodies, a novel ELISA was developed to allow distinguishing between antibodies that only bind to PAI-1 versus those antibodies that blocked PAI-1's function as tPA inhibitor (functional ELISA).

Hybridoma supernatants were screened in a novel functional ELISA to identify hybridoma supernatant from different clones having the ability to block tPA-PAI-1 interaction. The design of the functional ELISA is as follows: (1) if the antibody binds to PAI-1 but the antibody binding does not block formation of the covalent bond between PAI-1 and tPA, the anti-tPA antibody will bind to the tPA that is bound to the plate through PAI-1 and gives a positive readout; (2) if the antibody blocks PAI-1 and thereby blocks the tPA interaction by either changing PAI-1 confirmation or by steric hindrance, the anti-tPA antibody will not be able to bind to the plate and readout will be negative

(lower OD_{405}). In parallel, hybridoma supernatants were tested for binding to PAI-1 in the ELISA described in Example 2. Since the amount of antibody in the hybridoma supernatant is unknown, a lower than control reading (i.e., below the isotype control reading) was considered to be identifying an antibody of interest. Due to the variable antibody concentration in the supernatant, blocking in some cases was only partial.

Streptavidin coated plates (NUNC # 436014) were incubated for 2 hours at RT with 2ug/ml biotin-PAI-1 (human PAI-1 having N-terminal biotin labelled, active fraction; Molecular Innovations cat # NTBIOPAI-A) in 1% BSA/PBS at 50 ul/ml. Plates were blocked 1 hour with 200ul 1% BSA/PBS at RT and washed four times with 200 ul/well PBS. Purified antibody dilutions and hybridoma supernatants were added to wells at 50 ul/well and incubated for 15 minutes. Plates were washed four times with 200 ul/well PBS. Two-chain tPA (Innovative Research cat# HTPA-TC) at 1ug/ml was added to the plates at 50 ul/well and incubated for 30 minutes at RT. Plates were washed four times with 200 ul/well PBS. Anti-tPA HRP conjugated antibody (Life Span Technologies, cat#LS-C39721) at 1:3000 dilution were added to the plates and incubated for 45 minutes. Plates were washed four times with 200 ul/well PBS. ABTS substrate (one Tablet dissolved in 5 ml; Roche Diagnostics # 11 204 521 001) at 50ul/well was added to the plates and time allowed for color to develop. Plates were read on BioTek Synergy HT instrument using OD_{405}. ODs with the values that are lower than IgG isotype control indicate blocking of tPA binding to PAI-1.

In some cases functional ELISA was performed prior to Biacore supernatant screening and served as a selection step that was more important for hybridoma development. A representation curve with 33H1 as positive control, IgG1 as negative control and A44 as an identified positive antibody clone is shown in Figure 3.

Table 6: Functional ELISA for Hybridoma Supernatant Screening to Select for Antibodies that Block the Interaction of PAI-1 with tPA

CLONE	PAI-1 ELISA	tPA/PAI-1 Binding Inhibition	Selected	CLONE	PAI-1 ELISA	tPA/PAI-1 Binding Inhibition	Selected
A9	+	-	no	**C26**	+	+	yes
A20	+	-	no	**C45**	+	+	yes
A37	+	+	yes	**C46**	+	-	no
A39	+	+/-	yes	**C49**	+	-	no
A41	+	+	yes	**C61**	+	+	yes
A44	+	+	yes	**C66**	+	+	yes

A47	+	+	yes	**C69**	+	+	yes
A52	+	-	no	**C76**	+	-	no
A71	+	+	yes	**C79**	+	+	yes
A73	+	-	no	**C85**	+	-	no
A75	+	+	yes	**C109**	+	+	yes
A83	+	+	yes	**C118**	+	+	yes
A89	+	+	yes	**C134**	+	-	no
A93	+	-	no	**C145**	+	+	yes
A98	+	+	yes	**D4**	+	-	no
A99	+	-	no	**D12**	+	+	yes
A105	+	+	yes	**D13**	+	+	yes
A107	+	+	yes	**D15**	+	+	yes
A113	+	+	yes	**D31**	+	+	yes
A119	+	+	yes	**D33**	+	+	yes
B16	+	-	no	**D37**	+	+	yes
B18	+	+	yes	**D44**	+	+	yes
B28	+	+/-	yes	**D47**	+	+	yes
B29	+	+	yes	**D48**	+	+	yes
B32	+	+	yes	**D52**	+	+	yes
B58	+	+	yes	**D55**	+	+	yes
B85	+	-	no	**E4**	+	-	no
B89	+	+	yes	**E5**	+	-	no
B99	+	+	yes	**E11**	+	+	yes
B105	+	+	yes	**E16**	+	+	yes
B109	+	+	yes	**E20**	+	-	no
B118	+	+	yes	**E21**	+	+	yes

PAI-1 ELISA = a "+" represents binding to PAI-1 (see Example 2)

tPA/PAI-1 Binding Inhibition = a "+" score represents the interaction of tPA with PAI-1 is inhibited;

+/- = partial inhibition of the interaction of tPA with PAI-1

Over 200 supernatants were screened. Table 6 shows a selection of positive and negative hybridoma supernatants. About 10 hybridomas per fusion showed ability to block PAI-1 from binding to tPA in functional ELISA. Based on the data from the hybridoma supernatants, hybridomas were selected for sequencing and medium scale antibody production. Even though D4 did not bind

well to non-glycosylated PAI-1, it was selected for purification and sequencing based on its Biacore binding to glycosylated PAI-1. The purified antibodies were further characterized in Biacore for affinity kinetics, and in chromogenic and cellular assays for potency in comparison to the commercially available antibodies.

Example 5: Sequencing by 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) and Mouse Antibody Purification

Antibodies for a specific target generated from a series of fusions could have the same sequences. By performing antibody gene sequencing at an early stage of antibody generation, any possibly redundant antibodies were eliminated and the correct antibody gene sequences guided antibody selection and humanization as well as chimeric antibody construction.

5'-RACE is a procedure for amplification of nucleic acid sequences from a messenger RNA template between a defined internal site and unknown sequences at the 3′ or the 5′ end of the mRNA. This methodology of amplification with single-sided specificity has been described as "one-sided" PCR or "anchored" PCR. The original variable murine anti-human PAI-1 antibody sequence of the lead antibody was determined by 5'-RACE cDNA sequencing and confirmed by N-terminal protein sequencing.

To determine variable heavy (VH) and light chain (VL) IgG sequences, total RNA from hybridoma cells was isolated using RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Cat No. 74104) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells (5 x 106 cells) were lysed in 350 ul of the kit's RLT buffer followed by capturing total RNAs on spin column. RNA was eluted in the kit's TE buffer and stored on ice.

First-strand cDNA was prepared using SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (ClonTech, Cat No. 634923). The 5'-RACE protocol was performed according to the manufacturer's instructions. VH and VL chain cDNAs were separately amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the 5'-primers supplied with the SMARTer™ kit and the 3' VH and VL gene specific primers listed below :

Heavy Chain 3'- Primer: 5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA -3' (SEQ ID NO: 105)

Light Chain 3'- Primer: 5'-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAG -3' (SEQ ID NO: 106)

The amplified VH and VL genes were separately cloned into TOPO vector using TOPO TA cloning Kit (Invitrogen, Cat No. K4520-01). The procedures were performed according to the manufacturer's instructions. To transform bacteria, reaction mixtures were added into competent E. coli cells and incubated on ice for 20 minutes. The tubes, which contained the E. coli cells and the

reaction mixture, were heated at 42°C for 40 seconds and added 250 microliters of lit's SOC medium. After incubating the E. coli at 37°C for 60 minutes with shaking at 300 rpm, the bacteria were spread on LB agar plate containing 100 micrograms per ml of ampicillin followed by incubating at 37°C, overnight.

Upon confirmation of the inserted VH and VL gene by PCR, five bacteria clones were selected and propagated in LB broth containing 100 micrograms per ml of ampicillin for plasmid DNA preparation. The plasmid DNAs were isolated using QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Cat No. 27104) according to manufacturer's instructions. The VH and VL IgG genes of hybridomas were sequenced by the Sanger method and the CDRs were determined using the Contact definition (MacCallum *et al.*).

Monoclonal antibodies were produced in CELLine bioreactor flasks (Wilson Wolf Manufacturing Corp.; Cat. #CL350 or Cat # CL1000) according to the manufacturer's instructions in serum-free medium (Gibco Cat. #12045) and purified by Protein A/G chromatography (GE Healthcare Life Sciences, Cat. #28-4083-47 and #28-4082-53). Purified antibodies were further characterized in Biacore for affinity kinetics, and in chromogenic and cellular assays for potency in comparison to the commercially available antibodies.

Example 6: Functional chromogenic assay using purified antibody

Purified antibodies were tested in a chromogenic assay for the ability to block PAI-1. PAI-1 inhibits tPA function, therefore, antibodies that block PAI-1 will result in restoring tPA function. Chromogenic assays utilize proteolytic enzymes that act on their natural substrates (proteins and peptides) by hydrolyzing one or more peptide bond(s). This process is usually highly specific in the sense that only peptide bonds adjacent to certain amino acids are cleaved. Chromogenic substrates are peptides that react with proteolytic enzymes resulting in the formation of color which is quantifiable. Chromogenic substrates are made synthetically and are designed to possess selectivity similar to that of the natural substrate for the enzyme. Attached to the peptide part of the chromogenic substrate is a chemical group which when released after the enzyme cleavage gives rise to color. The color change can be followed spectrophotometrically and is proportional to the proteolytic activity.

A chromogenic assay was used to confirm the ability of the antibody to neutralize PAI-1 function as a tPA inhibitor. tPA is able to release pNA from the chromogenic substrate S2288. S228 in solution has no color, but after being exposed to tPA and subsequent release of pNA, the solution develops a yellow color that can be read at OD_{405}. Color formation can be observed over 2-3 hours to determine kinetics of the enzymatic reaction. PAI-1 is able to block the enzymatic activity of tPA in a concentration dependent manner.

A two-step chromogenic assay was performed. All reagents are at 10x concentration until the step when they were added to substrate solution. In the first step, PAI-1 potency in tPA inhibition was measured using the chromogenic assay (PAI-1 titration with fixed tPA concentration). The PAI-1 titration curve was analyzed to determine IC50 for PAI-1 blocking tPA activity. Afterward, the IC80 calculated from the curve was selected for further antibody interrogation for ability to neutralize PAI-1 blocking function and restore tPA enzymatic activity. Equal volumes (25 ul) of tPA (at 14 nM) (Innovative Research, Cat. No.IHTPA-TC) and glycosylated (active form) human PAI-1 (Molecular Innovations, Cat. No.GLYHPAI-A) or non-glycosylated (active form) mouse PAI-1 (Molecular Innovations Cat. # IMPAI) were combined and incubated using 3-fold serial dilutions of PAI-1 starting at 108 nM and fixed concentration of tPA. All protein dilutions were made with 1%BSA/PBS. The mixture was incubated in the wells of a 96-well microtiter plate for 15 minutes at room temperature. Then 200ul chromogenic substrate S2288 (1.25 mM) (Chromogenix, Cat. No. S-820852) diluted according to manufacturer's instructions is added to the wells and OD_{405} absorbance change at 405nm over 2 hours every 10 minutes is recorded to measure the residual tPA activity. For controls, background was measured in the absence of tPA (no enzymatic reaction), a positive control was no PAI-1 (100% tPA activity) and a negative control was PAI-1 at 10-fold excess of tPA (complete blocking of tPA activity). *See* Figure 4 for representative curves for 33B8, A44, 33H1 and IgG1.

For the second step, the functional properties of the antibodies were determined by assessing their ability to inhibit active PAI-1 and restore tPA function utilizing the PAI-1 neutralization assay. For this step, active PAI-1 12.5 ul (at 56 nM) was incubated with an equal volume of either PBS (Invitrogen, Cat. No.14190-144) containing 1% BSA (Sigma, Cat. No. A3059) or with serial 3-fold dilutions of antibody starting at 2 uM. Control and unknown antibodies were incubated at concentrations (5 fold dilutions) ranging from 0.1 to 300 nM with 3 nM PAI-1 and tPA was added to the mixture. All the ingredients were incubated at 10x concentration at room temperature and further diluted 10 fold with tPA substrate S2288 which upon cleavage by tPA changes color from clear to yellow. Samples were read at OD 405 for 2 hours every 10 minutes at 37°C. The mixture was allowed to react in the wells of a 96-well microtiter plate for 30 minutes at room temperature to achieve antibody-antigen complex formation. Then 25ul of tPA (at 14 nM which corresponds to IC_{80} inhibition of tPA activity) was added to the wells and incubated for 15 minutes at room temperature. Finally, 200ul 1.25 mM substrate S2288 diluted according to manufacturer's instructions was added to the mix. The absorbance change at 405nm is recorded to measure the residual tPA activity for 2 hours every 10min. One hundred percent PAI-1 activity is defined as the PAI-1 activity observed in the absence of antibody. Neutralization of PAI-1 activity by the antibody is calculated from the residual PAI-1 activity measured in the presence of the antibody. Controls were IgG1 as an isotype

control (negative) and 33H1 mAb and 33B8 mAb as positive controls. *See* Figure 5 for representative curves for B28, E16, E21, A75 and IgG1.

Orthologs of human PAI-1 inhibiting human tPA were tested in the two step chromogenic assay system. Titration of orthologs was performed as described above for human PAI-1 (*see* Figure 6 for representative curves of titrations) and tPA activity was determined by chromogenic method (*see* Figure 7 for representation curves for 33B8 and A44 against cyno and mouse PAI-1). Final concentration of human tPA used in the assay was 1.4 nM. 12.5 ul active PAI-1 (56 nM) was incubated with an equal volume of either PBS containing 1%BSA or with serial 3-fold dilutions of antibody starting at 2uM. The mixture was allowed to react in the wells of a 96-well microtiter plate for 30 minutes at room temperature. Then 25ul of tPA(14 nM) was added to the wells and incubated for 15 minutes at room temperature. To finalize reaction 200 ul tPA substrate S2288 (Chromogenix) (1.25 mM) was added to the mixture. Ortholog PAI-1 was obtained from Molecular Innovations: mouse PAI-1 (wild type active fraction; cat# MPAI); rat PAI-1 (wild type active fraction; cat# RPAI); and rabbit PAI-1 (stable mutant; cat# RbPAI-I91L) cyno PAI-1 (active cyno PAI-1) was produced in-house in *E.coli*. Because of the poor off-rates of the rabbit and rat orthologs in the Biacore screening (data not shown), screening of the antibodies against these orthologs was not performed.

Table 7: Activity of Antibodies against Orthologs and Glycosylation States of PAI-1 in Functional Chromogenic Assay

Clone ID	Isotype	PAI-1 Ortholog and Glycosylation Status			
		non-gly hPAI-1	gly hPAI-1	non-gly cPAI-1	non-gly mPAI-1
A37	IgG1	+/-	-	-	-
A39	IgG1	-	+++	-	-
A41	IgG1	+/-	-	-	-
A44	IgG1	+++	+++	+++	-
A47	IgG1	nd	-	-	-
A71	IgG1	+++	+++	+++	-
A75	IgG2a	+++	+++	+++	-
A83	IgG1	nd	+/-	+/-	-
A89	IgG2b	-	-	-	-
A98	IgG1	nd	nd	nd	nd
A105	IgG1	+++	+++	+++	-
A107	IgG1	+/-	-	-	-
A113	IgG1	-	-	-	-
A119	IgG2a	-	-	-	-
B18	IgG1	+	+	+	-

B28	IgG2b	-	+++	-	-
B29	IgG1	-	-	-	-
B32	IgG1	nd	-	-	-
B58	IgG1	nd	+	+	-
B89	IgG1	nd	-	-	-
B99	IgG2a	nd	+	+	-
B105	IgG1	-	-	-	-
B109	IgG1	+++	+++	+++	-
B118	IgG1	+	+	+	-
C26	IgG1	++	++	++	+
C45	IgG2b	+++	+++	+++	-
C61	IgG1	+	+	+	-
C66	IgG1	+	+	+	-
C69	IgG1	++	++	++	-
C79	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C109	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C118	IgG1	++	++	++	-
C145	IgG2b	++	++	++	-
D4	IgG2a	+	++	+	-
D12	IgG1	+	+	+	-
D13	IgG1	-	-	-	-
D15	IgG1	+	+	+	-
D31	IgG1	++	++	++	-
D33	IgG1	-	-	-	-
D37	IgG2a	-	-	-	-
D48	IgG2a	-	+/-	-	-
D52	IgG1	+	+	+	-
E11	IgG1	++	++	++	-
E16	IgG1	+++	+++	+++	-
E21	IgG2b	+++	+++	+++	-
h=human, c=cynomolgus monkey, m=mouse, nd=not determined "-"=no activity, "+/-"=partial activity' "+"=slight activity, "++"=moderate activity, "+++"=strong activity					

One or more antibodies from each fusion demonstrated ability to block both cyno and human PAI-1 inhibitory function in this assay, with about 14 antibodies having moderate to strong blocking activity. A39 and B28 had a unique profile in that these two antibodies blocked glycosylated hPAI-1 but had no activity against human or cyno non-glycosylated PAI-1. None of the antibodies were able to block mouse PAI-1 activity efficiently (within 10 fold of the human PAI-1) except for C26.

Example 7: Mechanism of action for monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies can inhibit PAI-1 by three different mechanisms: a) by steric hindrance, b) by converting PAI-1 into a latent conformation upon binding, and c) by converting PAI-1 into a substrate for tPA conformation instead of the inhibitor ("substrate conformation"). PAI-1 makes a covalent bond with tPA upon interaction with serine protease.

The chromogenic assay and SDS-PAGE techniques were used to identify antibody mechanism of action. A reaction between monoclonal antibody (or control antibodies), PAI-1 and tPA was carried out as described above for the functional chromogenic assay. Samples were mixed with Laemmli sample buffer and loaded on SDS-PAGE gel under non-reducing conditions and ran for 30 minutes. Afterwards, the gels were stained with Coomassie blue to visualize proteins, complexes and the cleaved form of PAI-1. Control monoclonal antibodies with known mechanism of action were used as comparators. 33B8 is known to convert PAI-1 into a latent conformation and 33H1 is known to convert PAI-1 into a substrate conformation. This assay could positively identify the substrate conformation but was unable to distinguish between latent conformation or steric hindrance. Representative SDS-gels are shown in Figures 8, 9 and 10.

Table 8: Mechanism of Action of Monoclonal Antibodies

Antibody	Mechanism of Action
A44	Converts PAI-1 from Active → Substrate Conformation
C26	Converts PAI-1 from Active → Substrate Conformation
C45	Converts PAI-1 from Active → Substrate Conformation
E21	Converts PAI-1 from Active → Substrate Conformation
A39	Converts PAI-1 from Active → Latent Conformation or Steric Hindrance
B109	Converts PAI-1 from Active → Latent Conformation or Steric Hindrance
E16	Converts PAI-1 from Active → Latent Conformation or Steric Hindrance

A44, C26, C45 and E21 block PAI-1 activity by converting PAI-1 form the active conformation to the substrate conformation. A39 and B109 have a different mechanism of action, but the assay was unable to distinguish whether these antibodies block PAI-1 activity by changing PAI-1 from the active conformation to the latent conformation or by steric hindrance.

Example 8: Purified Antibody Binding Kinetics

In kinetics measurement, the antibodies were evaluated in reverse at 25°C. In the reverse assay, PAI-1 antibodies were captured to the anti-mouse IgG Fc antibody surface prepared on CM5 chip followed by injecting the serial 2x dilutions of PAI-1 proteins (human or cyno) starting at 40 nM. A high flow rate was chosen at 50ul/min to avoid mass transportation limitation. Two thousand seconds was allowed for dissociation time to accommodate for the slow off rate of the selected

antibodies. The chip was regenerated by glycine-HCl, pH 1.7 buffer after each round of antibody-PAI-1 binding. Kinetics data analysis was performed using Biacore BIAevaluation software. The sensorgrams were double-referenced by subtracting the reference flow cell values and the blank buffer values. The sensorgrams were fitted by using the simulated kinetics 1:1 (Langmuir) model with local Rmax. The data for the antibodies tested are shown below in Table 9.

Table 9: Binding Kinetics by Biacore Reverse Assay

Antibody	human PAI-1		cyno PAI-1	
	Dissociation Rate kd (1/s)	Affinity KD (M)	Dissociation Rate kd (1/s)	Affinity KD (M)
A39	7.09E-05	1.16E-11	ND	ND
A44	1.49E-05	3.76E-12	<= 1.0E-6	<=1.0E-13
A75	4.76E-04	1.20E-10	ND	ND
A105	1.64E-04	4.23E-11	ND	ND
B28	4.61E-04	6.5E-10	ND	ND
ND = not determined				

Binding kinetics of representative antibodies were further analyzed and compared in Biacore forward assay with vitronectin and PAI-1 complex. In the forward assay, human vitronectin protein was immobilized onto the CM5 chip in flow cells Fc1-Fc4 by amine coupling. Human PAI-1 was then captured to the vitronectin surface in flow cells Fc2-Fc4 as ligand. Fc1 was reserved as reference cell. The antibodies were diluted 2x starting from 40 nM and injected to Fc1-4. Kinetics data analysis was performed using Biacore BIAevaluation software. The sensorgrams were first double-referenced by subtracting the reference cell values and the blank buffer values, and then fitted by 1:1 (Langmuir) model was used with global Rmax.

Table 10: Kinetics of A44 binding to human vitronectin captured human PAI-1 in Biacore forward assay

A44 binding to Vn captured hPAI-1	kd (1/s)	KD (M)
	<= 1.0E-6	<=1.0E-12

Data in Table 10 indicated that A44 binds free human PAI-1as well as PAI-1 in vitronectin complex.

Example 9: Functional assay in primary human cells

To further investigate each antibody's ability to restore downstream plasmin production by primary human cells, a plasmin generation assay was used. Only antibodies that showed high potency in the chromogenic assay and good affinity in Biacore were used tested in this assay.

On day 1, human primary hepatic stellate cells (Sciencell CA, cat no SC5300) were plated at 20000cells/well in starvation medium (DMEM Gibco+glutamax-1 4.5g/L D-Glucose, Pyruvate (31966-021), 0.2% Fetal Bovine Serum gold PAA (A11-152)) at 37°C under 5% CO2. On day 2, to neutralize PAI-1 activity, antibodies were pre-incubated with recombinant PAI-1 (Molecular Innovation, cat# IGLYHPAI-A, recombinant Glycosylated human PAI-1, final concentration 5 nM) for 15 minutes at room temperature. At the same time, tPA (Molecular Innovations (cat# HTPA-TC), 5 nM in DMEM without red phenol) was incubated with cells for 15 minutes at 37 °C. After washing unbound tPA, PAI-1/mAb mixtures were added on the cells and then residual tPA activity was measured by adding and glu-Plasminogen/Substrate mixture (Glu-Pg: Sigma cat# 9001-91-6; 0.5µM final concentration) and plasmin chromogenic substrate: (CBS00.65 Stago cat # 00128, 0.5mM final concentration).

Plasminogen activation to plasmin is detected by kinetic reading every 45 seconds of A405/492 nm using spectrophotometer (IEMS, Thermofisher) thermostated at 37°C. Biolise software (Thermofischer) calculates the maximal rate of chromogenic substrate cleavage: plasmin generation expressed as Vmax: maximal rate of A405/492 nm per min (mDO/min) calculated. PAI-1 inhibition is then calculated with tPA alone as reference (100% inhibition) and PAI-1 (without mAb, as no inhibition) and plotted using Biostat speed software to calculate IC_{50} and Imax.

Table 11: Plasminogen Generation in Human Primary Hepatic Stellate Cells

Antibody	IC_{50abs} mean± sem (nM)	I_{max} mean (%)	n
A44	3.32 ± 0.34	97	7
A39	5.4 ± 0.8	99	3
A71	8.61 ± 3.6	90	3
A75	22.6 ± 8.2	66	4
A105	27± 7.8	88	3
B28	7.28 ± 2.7	90	3
B109	6.11 ±0.88	94	3
C26	Inactive	n/a	2
C45	6.5±1.11	97	4
E16	4.74 ± 2.27	95	3
E21	Inactive	n/a	3
33H1	22.92 ± 12	56	3
33B8	Inactive	n/a	3
n/a = not applicable			

Example 10: Antibody binding epitope exploration by Biacore competition assay

A selected group of anti-PAI-1 antibodies with superior binding and blocking activities were explored for their potential binding epitopes in Biacore competition assays. In the assays, the newly identified antibodies as well as several commercially available anti-PAI-1 antibodies with known binding site on human PAI-1 were set up to compete for binding to human PAI-1 protein. Each antibody was immobilized onto a flow cell in Biacore CM5 chip using standard amine coupling reaction. All tested antibodies except for clone B28 retained binding site activity after amine coupling. Human PAI-1 protein was captured to the immobilized antibody on the chip followed by injection of each antibody as analyte. Only the analyte antibodies that have different binding sites on human PAI-1 from the immobilized antibody will show additional binding signals in Biacore. The competition experiments were repeated twice for each immobilized antibody and the results are show in the following Table.

Table 12: Summary of Binding Epitopes from Biacore competition assay

		Analyte Antibody											
Immobilized Antibody		33H1	33B8	A44	31C9	A71	A75	B109	B28	C45	C26	E16	E21
	33H1	c/c	b/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/c
	33B8	b/b	c/c	b/b	b/c	b/b	b/b	b/b	p/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	A44	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	c/c	b/b
	31C9	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	A71	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	A75	b/b	p/p	b/b	p/p	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b
	B109	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/c	b/b
	B28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C45	b/b	p/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b
	C26	b/c	p/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/c	b/b	c/c	b/b	c/c
	E16	b/b	p/b	b/c	b/b	b/b	p/b	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	b/b
	E21	b/c	b/c	b/b	b/c	b/c	b/b	b/b	b/c	b/b	b/c	b/b	c/c
	p=partial binding by the analyte antibody, c=competition by the analyte antibody, b=binding by the analyte antibody;" – "= no PAI-1 binding to the immobilized antibody; nt = not tested												

When A44 is immobilized and binds PAI-1, C45 (analyte antibody) is unable to bind to PAI-1 that is bound by A44. Therefore, C45 competes for the same binding site that A44 binds on PAI-1 (denoted in Table 12 as "c/c") or A44 binding to PAI-1 interferes with C45 binding to PAI-1. This

analysis is confirmed when the experiment is repeated in the reverse order. Specifically, when C45 is the immobilized antibody and is bound to PAI-1, A44 as the analyte antibody is unable to bind the PAI-1 that is bound to C45 (denoted in Table 12 as "c/c"). In a similar analysis, A71 and A75 compete for the same site on PAI-1. The Biacore analysis confirmed that A44 and C45, as well as A71 and A75, compete with or to interfere with each other when binding to PAI-1.

Conversely, the commercially available antibodies, 33H1 and 33B8, do not compete with A44. When A44 is the immobilized antibody and is bound to PAI-1, both 33H1 and 33B8 are able to still bind to the PAI-1 that is bound to A44 (denoted as "b/b" in Table 12). This is confirmed in the reverse experiment. When PAI-1 is bound to immobilized 33H1 or immobilized 33H8, A44 is still able to bind to PAI-1. Thus, the commercial antibodies 33H1 and 33B8 do not compete with or interfere with A44 binding to PAI-1.

Interestingly, some immobilized antibodies (i.e., B109) blocked analyte antibody (i.e., 33B8) from binding to the captured PAI-1 protein; but, when switching the positions of the immobilized antibody to the analyte antibody (e.g., flipping the pair on the chip), the antibody pair no longer competed for binding with each other to PAI-1. For example, when B109 was the immobilized antibody bound to PAI-1, 33B8 was unable to bind PAI-1. However, when 33B8 was the immobilized antibody binding PAI-1, B109 was able to bind PAI-1. One possible explanation for this result is that when the immobilized antibody is bound to PAI-1, PAI-1 may shift to an unfavorable conformation for the second or analyte antibody and prevents the analyte antibody from binding (for instance, when B109 is the immobilized antibody and 33B8 is the analyte antibody). However, when the antibody pair is reversed, the immobilizing antibody may bind in such a manner that PAI-1 conformation is relatively unchanged, thus allowing the analyte antibody to bind to the bound PAI-1 (i.e., the analyte antibody B109 is able to bind PAI-1 that is bound by the immobilized antibody 33B8). Therefore, the competition observed between 33B8 and B109 was not due to overlapping binding sites on PAI-1 but likely due to a conformational change in PAI-1 when bound to B109.

Another interesting observation was that B28 lost binding to human PAI-1 when immobilized via amine coupling, suggesting B28's CDR regions involve amino acids with primary amine group(s).

Example 11: Selection of mouse monoclonal antibody for humanization

Table 13 shows a summary of the *in vitro* data characterizing the most active monoclonal antibodies from the five fusions performed. Based on these data, A44 was selected for humanization because A44 was the most potent antibody in the chromogenic assay and in plasmin generation while having the highest affinity in Biacore.

Table 13: Summary of Monoclonal Antibody Affinity and Potency against Human Glycosylated PAI-1

Antibody	Chromogenic Assays (nM)	Plasmin Generation (nM)	Affinity Kd (M)	Mechanism of Action
A39 (IgG1/k)	1.70, 1.00	5.4	1.16E-11	SH or latent
A44 (IgG1/k)	1.66, 1.50, 1.70	3.32	4.20E-14	substrate
A71 (IgG1/k)	Approx. 4.00	8.61	ND	SH or latent
A75 (IgG2a/k)	3.00	22.6	1.20E-10	SH or latent
A105 (IgG1/k)	7.00	27.0	4.20E-11	SH or latent
B28 (IgG2b/k)	1.80	7.28	6.5E-10	SH or latent
B109 (IgG1/k)	0.23	6.11	ND	SH or latent
C26 (IgG1/k)	5.00	Inactive	ND	substrate
C45 (IgG2b)	0.5	10.6	ND	substrate
E16 (IgG1)	1.1	4.74	ND	SH or latent
E21 (IgG2b)	1.3	216.0	ND	substrate
SH = steric hindrance; ND = not determined				

The heavy and light chain sequences shown in Table 1 are aligned in Figure 12 and CDRs, as defined by IMGT, are highlighted in bold. Based on the in vitro data presented in the Table 13, A44 was selected for humanization.

Example 12: Engineering of the anti-PAI-1 A44 Fab: humanization, stabilization and mutation of unwanted sequence motifs

Several approaches discussed below were taken to humanize, stabilize and optimize the sequence motifs of the A44 murine antibody against PAI-1.

1) Humanization

The humanization protocol used has been described in PCT/US08/74381 (US20110027266), herein incorporated by reference in its entirety. The variable light (VL) and variable heavy (VH) sequences of murine A44 were used to build a homology model of anti-PAI-1 A44 light chain (LC) and heavy chain (HC) in Molecular Operating Environment (MOE; v. 2010.10; Chemical Computing Group). The following templates were used: light chain framework – 1D5I (94% identity in the framework regions), heavy chain framework – 3KSO (96% identity in the

framework regions), L1 – 1D5I (94% identity), L2 – 1D5I (94% identity), L3 – 1AXS (72% identity), H1 – 1IC7 (82% identity), H2 – 1MBU (68% identity) and H3 – 2WDB (62% identity). The H3 loop was particularly difficult to model since Trp is the first residue. 2WDB, although a shorter loop, also has a Trp at the beginning of the loop and the same Phe-Asp-Tyr sequence at the end of the H3 loop. The side-chains of Glu-105 (LC) and His-99 were rebuilt and the subsequent model was energy minimized using the standard procedures implemented in MOE. A molecular dynamics (MD) simulation of the minimized 3D homology model of the murine A44 was subsequently performed, with constraints on the protein backbone at 500 K temperature for 1.1 nanoseconds (ns) in Generalized Born implicit solvent. Ten diverse conformations were extracted from this first MD run every 100 picoseconds (ps) for the last 1 ns. These diverse conformations were then each submitted to a MD simulation, with no constraints on the protein backbone and at 300 K temperature, for 2.3 ns. For each of the 10 MD runs, the last 2,000 snapshots, one every ps, from the MD trajectory were then used to calculate, for each murine A44 amino acid, its root mean square deviations (rmsd) compared to a reference medoid position. By comparing the average rmsd on the 10 separate MD runs of a given amino-acid to the overall average rmsd of all A44 murine amino-acids, one decides if the amino-acid is flexible enough, as seen during the MD to be considered as likely to interact with T-cell receptors and responsible for activation of the immune response. 37 amino-acids were identified as flexible in the murine A44 antibody, excluding the CDR and its immediate 5 Å vicinity.

The motion of the 62 most flexible murine A44 amino acids, during the 20 ns (10 x 2 ns), were then compared to the motion of the corresponding flexible amino-acids of 49 human germline homology models, for each of which were run the 10 x 2 ns MD simulations. The 49 human germline models were built by systematically combining the 7 most common human germline light chains (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) and 7 most common human germline heavy chains (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). The vk1-vh2 human germline antibody showed 0.58 4D similarity of its flexible amino-acids compared to the flexible amino-acids of the murine A44 antibody; the vk1-vh2 germline antibody was therefore used to humanize A44 antibody focusing on the flexible amino-acids. The vlambda3-vh4 human germline showed the second highest 4D similarity, 0.57, and was also used as the basis for humanization of the A44 antibody. For the pair wise amino-acid association between murine A44 and vk1-vh2 amino-acids, the 2 sequences were aligned based on the optimal 3D superposition of the alpha carbons of the 2 corresponding homology models. The pair wise amino-acid association between murine A44 and vlambda3-vh4 was performed in a similar manner. Figure 13 shows the alignment of murine A44 light chain with vk1 and vlambda3. Figure 14 shows the alignment of murine A44 heavy chain with vh2 and vh4.

2) Stabilization

a) Knowledge-based approach

The amino-acids of the light and heavy chains with low frequency of occurrence vs. their respective canonical sequences, excluding the CDRs, were proposed to be mutated into the most frequently found amino-acids (ΔΔGth > 0.5 kcal/mol; (E. Monsellier, H. Bedouelle. J. Mol. Biol. 362, 2006, p. 580-593)). This first list of consensus mutations for the LC and HC has been restricted to the amino-acids found in the closest human germline (vk1-vh2). Suggested changes in the immediate vicinity of the CDRs (5 Angstroms "Vernier" zone (J. Mol. Biol. 224, 1992, p. 487-499)) were removed from consideration. This resulted in two stabilizing mutations in the LC (*see* Table 15) and five stabilizing mutations in the HC (*see* Table 16). Other criteria were taken into account to consider these mutations for potentially stabilizing the anti-PAI-1 A44 antibody. These criteria were a favorable change of hydropathy at the surface or a molecular mechanics based predicted stabilization of the mutant. Also, additional stabilizing mutations reported to be successful in the literature (E. Monsellier & H. Bedouelle, J. Mol. Biol., 362, 2006, p. 580-593; B.J. Steipe et al. J. Mol. Biol, 1994, 240, 188-192) and were considered (see Tables 17 & 18), however, no additional mutations were suggested.

Table 15: Stabilizing Changes Proposed in Light Chain

Residue	Proposed Change	Calculated ΔΔGth	Accept Change
Lys-3	Val	2.23998	No – not in germline
Met-11	Leu	0.766432	Already changed in humanization
Tyr-12	Ser	2.04389	Already changed in humanization
Leu-36	Val	2.17091	No - Vernier
Lys-42	Gln	0.939652	No – not in germline
Thr-46	Leu	2.01966	No-Vernier
Gln-69	Thr	2.16357	No-Vernier
Tyr-80	Ala	2.92454	Already changed in humanization
Met-83	Leu	2.57007	Already changed in humanization
Gly-84	Ala	0.597822	Yes
Ile-85	Thr	1.27255	Yes

Table 16: Stabilizing Changes Proposed in Heavy Chain

Residue	Proposed Change	Calculated ΔΔGth	Accept Change
Glu-1	Gln	0.562423	Yes
Met-2	Val	3.41361	No – Vernier
Glu-6	Gln	0.655069	No – Not in germline
Pro-9	Ala	0.505324	No – Not in germline
Ser-10	Glu	2.40018	Already changed in

			humanization
Gln-16	Ala	1.11244	No – Not in germline
Thr-17	Ser	1.79135	No – Not in germline
Leu-18	Val	0.760243	No – Not in germline
Ser-19	Lys	1.20539	No – Not in germline
Thr-21	Ser	1.3289	No – Not in germline
Ser-23	Lys	1.82798	No – Not in germline
Val-24	Ala	1.35286	No – Not in germline
Thr-25	Ser	1.72008	Yes
Ile-37	Val	1.66985	No – Not in germline
Arg-38	Lys	0.568427	No – Not in germline
Lys-39	Gln	2.27769	Yes
Phe-40	Arg	1.81199	No – Not in germline
Asn-43	Lys	1.42568	Already changed in humanization
Lys-44	Gly	2.01606	Already changed in humanization
Tyr-47	Trp	2.62805	No – Vernier
Met-48	Ile	1.67766	No – Vernier
Pro-61	Glu	1.08569	No – Not in germline
Ser-62	Lys	0.840485	No – Not in germline
Leu-63	Phe	1.25428	No – Not in germline
Arg-66	Lys	0.528008	No – Not in germline
Ile-67	Ala	1.93707	No – Vernier
Ser-68	Thr	1.36475	Yes
Ile-69	Leu	0.550185	No – Vernier
Arg-71	Val	0.61536	No – Vernier
Asn-72	Asp	3.40632	Yes
Thr-73	Lys	0.5597	No – Vernier
Lys-75	Ser	0.81321	No – Not in germline
Asn-76	Ser	0.744463	No – Not in germline
Gln-77	Thr	1.30652	No – Not in germline
Tyr-78	Ala	2.54699	No – Vernier
Val-85	Leu	1.71111	No – Not in germline
Thr-87	Ser	1.30394	No – Not in germline
Thr-90	Ser	0.557686	No – Not in germline
Thr-92	Val	1.13795	No – Not in germline

Table 17: Combinations of stabilizing mutations evaluated

Combination*	Additional changes suggested	Accept Change
L1 (40->P & 42->Q)	None – neither changed	No changes
L2 (45->K)	None – already K45	None
L3 (74->T)	None – already T74	None
L4 (76->S)	None – already S76	None
L5 (84->A, 85->T)	None – already changed in stabilization	None
H1 (15->G)	None – not in germline	None
H2 (61->E, 62->Lys, 63->Phe)	None in germline	None

H3 (86->T, 87->S, 88->E)	87 and 88 not in germline	None
S1 (L1 & L5)	None	No
S2 (H1 & H3)	None	No
*Note: Sequential numbering used to refer to residues		

Table 18*: Stabilization mutations evaluated

Light Chain Residue*	Additional changes suggested	Accept Change
15->L	V15->L	No – V15 in Vk1 germline
90->Q	None – already Q90	None
32->Y	None – already Y32	None
106->I	None – already I106	None
63->S	None – already S63	None
21->I	None – already M21	None
*Note: Sequential numbering used to refer to residues		

b) 3D and MD-based approaches

3D and MD-based approaches have been previously reported (Seco J., Luque F.J., Barril X., J. Med. Chem. 2009 Apr 23:52(8):2363-71; Malin Jonsson et al., J. Phys. Chem. B 2003, 107:5511-5518). Hydrophobic regions of the antibody were explicitly identified by analyzing the molecular dynamics simulation of the Fab in a binary solvent (20% isopropanol in water, 20 ns production simulation). Additional analysis using a hydrophobic surface map within Schrodinger's maestro software (v. 8.5.207) was completed. The protein surface analyzed by these two methods is quite hydrophilic. Even with both these techniques, no residues contributing to any hydrophobic patches on the surfaces were present therefore, no anti-aggregation mutations were suggested.

3) Humanization by Grafting

Humanization using grafting techniques has previously been reported (P. T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, G. Winter, Nature 1986, 321:522-525). The humanization started by identifying the two closest human germlines to anti-PAI1 A44 variable domain light and heavy chains. This was done by performing a BLAST search *vs.* all the human germlines which were systematically enumerated (all possible combinations of the V & J domains for the kappa and lambda chains; V, D and J domains for the heavy chains). The BLAST searches were performed using an intranet application linked to the Sequence Information Retrieval and Analysis (SIRA) service provide by the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The closest human germline were identified with 70% and 67% sequence identity to anti-PAI1 A44 variable domain light and heavy chains, respectively. Using the internal VBASE germline sequences, the light chain was found to be close to V I-O18 (approximately 64% identity) locus and the heavy chain was close to 4-30 (approximately 69% identity) locus of the VH4 sub-family. CDR regions (based on Kabat) and Vernier residues are indicated in italics for mA44 light chain (A44LC)

and for IGVK1-33-01_IGKJ4-01 (IGVK1). Vernier residues as defined in J. Mol. Biol., 1992, 224, 487 are underlined. The humanizing mutations (in boldface) were obtained by performing a pairwise comparison of the two aligned sequences, excluding the CDR & Vernier zone residues (also underlined in murine) as defined above. T46L and Q69T from the murine light chain and M2V in the murine heavy chain (Vernier zone residue) were mutated to the predominantly conserved human germline sequence as one part of the humanization by grafting approach (LC5a, HC5a). In another variant, these three Vernier zone residues were retained as seen in the original murine sequence (LC5b, HC5b).

mA44 – Light chain (SEQ ID NO: 141)

DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

*ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSLEY EDMGIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

GTKLEIK

IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (SEQ ID NO: 107)

DIQMTQSPSS **L**SASV**G**DRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD

ASNLETGVPS RFSGSGSGTD **F**T**F**TISSL**Q**P EDI**A**TYYCQQ YDNLPLTFGG

GTK**V**EIK

*m*A44 – Heavy chain (SEQ ID NO: 140)

E*M*QLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT*GDSMT NGYWN*WIRKF

PGNKLE*YMGY ITYSGSTY*YN PSLKGR*ISI*T *R*N*T*SKNQ*Y*YL

QLSSVTTEDT ATYYC*ARWHY GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 (SEQ ID NO: 108)

QVQLQESGP**G** LVKPS**E**TLSL TC**T**VSGGSVS SYYWSWIR**Q**P

PG**K**GLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVT**I**S V**D**TSKNQFSL

KLSSVTAADT AVYYCARGYS SSWYYFDYWG QGTLVTVSS

The next closest human germline was identified with 59% and 58% sequence identity to anti-PA11 A44 variable domain light and heavy chains, respectively. Using the internal VBASE germline, this light chain is found to be close to VκIII-L6 (~56% identity) locus and the heavy chain close to 6-01 locus of the VH6 sub-family. CDR regions (based on Kabat) and Vernier regions and are indicated in italics. Vernier regions (as defined in *J. Mol. Biol.*, **1992**, *224*, 487) and underlined. The humanizing mutations were obtained by performing a pairwise comparison of the 2 aligned sequences, excluding the CDR & Vernier zone residues (also underlined in murine) as defined above and are shown in boldface.

mA44 – Light Chain (SEQ ID NO: 141)

DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

*ANRSVD*GVPS RFS*GSGSGQD YSLTISSLEY* EDMGIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

GTKLEIK

IGKV3-11-02_IGKJ4-01 (SEQ ID NO: 143)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP **GQAPRLLIYD**

ASNRATG**IPA** RFSGSGSGRD **FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ** RSNWPLTFGG

GTK**V**EIK

mA44 – Heavy Chain (SEQ ID NO: 140)

E*M*QLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT*GDSMT N..GYWN*WIR

KFPGNKLE*YM GYIT..YSGS TY*YNPSLKGR *ISITRNTSKN*

Q*Y*YLQLSSVT TEDTATYYC*A RWHYGSPYYF DYW*GQGTTLT VSS

IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 (SEQ ID NO: 144)

QVQLQQSGPG LVKPSQTLSL TCAISGDSVS SNSAAWNWIR

QSPSRGLEWL GRTYYRSKWY NDYAVSVKSR ITINPDTSKN

QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA RGYSSSWYYF DYWGQGTLVT VSS

4) Mutation of unwanted sequence motifs

The following motifs of sequences were considered: Asp-Pro (acid labile bond), Asn-X-Ser/Thr (glycosylation, X=any amino-acid but Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (succinimide/iso-asp formation in flexible regions), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (exposed deamidation sites), and Met (oxidation in exposed areas). The VL & VH domains of murine anti-PAI1 A44 possess two potential glycosylation sites: $N^{52}RS$ (in CDR2) in the LC and $N^{72}TS$ in the HC. One exposed deamidation site is present in CDR1 of the HC ($N^{31}G$). Three potential sites of succinimide formation were identified in the original murine sequence: $D^{56}G$ (end of CDR2) in the LC, and $D^{27}S$ (in CDR1) and $D^{89}T$ in the HC. The LC problematic motifs, $N^{52}RS$ and $D^{56}G$, are both in CDR2. Since these mutations occur in a CDR, they were addressed by mutation in two proposed engineered sequences below (LC2 and LC4). N^{52} was conservatively mutated to Gln and D^{56} was mutated to Glu. There are four existing problematic residues in the HC. The first two occur in CDR1: the potential succinimide formation site, $D^{27}S$, and the deamidation site $N^{31}G$. Two additional problematic motifs also occur in the third framework region. In CDR1, D^{27} was mutated to an E to avoid the formation of succinimide, while N^{31} was altered to a Q. N^{72} and D^{89} were altered to Q and E, respectively. These problematic motifs were addressed in engineered sequences HC2a and HC4 described below. The HC2b variant contains only the mutation of the $N^{31}G$ deamidation site.

The resulting humanized sequences were blasted for sequence similarity against the IEDB database (found on the world wide web at immuneepitope.com, version June 2009; Vita R., Zarebeski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The immune epitope database 2.0 Nucleic Acids Res. 2010, Jan, 38 (Database issue):D854-62. Epub 2009, Nov 11) to ensure that none of the sequences contain any known human B- or T-cell epitopes (sequence identity of 70% used as cut-off for the results obtained through BLAST search and considering only the results from human species). DeClerck, *et al.* (International Publication No. WO 2002034776) have disclosed antibody binding epitopes of PAI-1, none of which are problematic for the epitopes disclosed herein.

For the murine A44 LC, there is one human epitope from Kirschmann *et al.* (The Journal of Immunology, 1995, 155, 5655-5662). It possesses ~71% identity over a 14 amino acid stretch as seen below. The subject sequence was a partial sequence that had not been verified by mass spectrometry.

No binding data is reported for this peptide. This epitope was seen in all the LC variants proposed. No potentially problematic epitopes were identified when a similar search was performed for the HC.

5) Original sequences of anti-PAI1 variable domains

CDRs are highlighted in bold and Vernier regions are (as defined by Foote & Winter, J. Mol. Biol., 1992, 224:487-499) are underlined.

Light Chain (SEQ ID NO: 142)

1 DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITC**KASQDIN SYLS**WLQQKP GKSPKTLIY**R**
51 **ANRSVDG**VPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYC**LQ YDEFPPT**FGG
101 GTKLEIKRAD AAPTVSIF

Germinality index = 70% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-O18]

Heavy Chain (SEQ ID NO: 140)

1 EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVT**G**DSMT **NGYWN**WIRKF PGNKLEYMG**Y**
51 **ITYSGSTYYN** PSLKGRISIT RNTSKNQYYL QLSSVTTEDT ATYYCAR**WHY**
101 **GSPYYFDY**WG QGTTLTVSS

Germinality index = 67% with IGHV4-59-02_IGHD6-137-01_IGHJ4-02 [VH4 4-30]

6) Engineered sequences

4D humanization and grafting approaches were applied to the closest two human germline sequences

a) Engineered light chain sequences

LC1a contains seven mutations derived from the 4D humanization method using the closest germline sequence, vk1. LC1b has 12 mutations derived from the 4D humanization to the second closest human germline sequence, vl3. LC2 contains 2 additional mutations in CDR2 as compared to LC1a. These mutations address a potential glycosylation site ($N^{52}RS$) and a potential site of succinimide formation ($D^{56}G$). LC3 contains the mutations from the 4D humanization to the closest germline sequence with an additional 2 stabilizing mutations. LC4 combines the humanizing, stabilizing and unwanted motif mutations. CDRs and vernier zones are in italics, vernier residues are underlined, humanizing mutations are in boldface, problematic motifs are in double strikethrough and stabilizing mutations are shown in lower case. Figures 16 and 17 show summaries of the mutations.

LC1a (SEQ ID NO: 91):

1 D*I*K*M*TQSPSS **L**SASVG**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** EDLGIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKLEIK

No additional human epitopes for sequence LC1a found in IEDB database. LC1a germinality index = 76% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC1b (SEQ ID NO: 92):

1 D*I*K*M*TQSPSS **VSVSPGQT**VT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP G**Q**SPK*TLIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QA MDE**GIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKL**T**IK

In addition to the epitope described in section 4 above, K39PGQSPKTLI has 70% sequence identity to KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). This peptide is reported to have an IC50 >100,000 nM against all the HLA-DR alleles for which it was tested. LC1b germinality index = 67% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC2 (SEQ ID NO: 93):

1 D*I*K*M*TQSPSS **L**SASVG**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

51 *A~~Q~~RSV~~E~~*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** EDLGIYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKLEIK

No additional human epitopes for sequence LC2 were found in IEDB database.

LC2 germinality index = 76% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC3 (SEQ ID NO: 94):

1 D*I*K*M*TQSPSS **L**SASVG**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** EDLatYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKLEIK

No additional human epitopes for sequence LC3 were found in IEDB database. LC3 germinality index = 78% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC4 (SEQ ID NO: 95):

1 D*I*K*M*TQSPSS **L**SASVG**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKSPK*TLIYR*

51 *A~~Q~~RSV~~E~~*GVPS RFS*G*S*G*S*GQ*D *Y*SLTISSL**QP** EDLatYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKLEIK

No additional human epitopes for sequence LC4 were found in IEDB database. LC4 germinality index = 78% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC5a (SEQ ID NO: 96):

1 D*I*Q*M*TQSPSS **L**SASVG**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKAPK**L***LIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*GSGSGT*D *Y***TF**TISSL**QP** ED**IA**TYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKVEIK

In addition to the epitope described in section 4 above, A43PKLLIYRAN has 80% sequence identity to APKLLIYAASSL (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). The molecular weight was not determined on this peptide and no binding data was reported. LC5a germinality index = 85% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC5b (SEQ ID NO: 97):

1 D*I*Q*M*TQSPSS **L**SASVG**D**RVT ITC*KASQDIN SYLSWL*QQKP GKAPK*TLIYR*

51 *ANRSVD*GVPS RFS*GSGSGQ*D *Y***TF**TISSL**QP** ED**IA**TYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKVEIK

No additional human epitopes for sequence LC5b were identified in IEDB database.

LC5b germinality index = 83% with IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [VκI-O18].

LC5c (SEQ ID NO: 98):

1 E*I*V*M*TQSPA**T** **LSLSP**GERA**T** **LSC***KASQDIN SYLSWL*QQKP GQ**A**PR*TLIYR*

51 *ANRSVD*G**I**P**A** RFS*GSGSGQ*D *Y***T**LTISSL**EP** ED**FA**VYYC*LQ YDEFPPTF*GG

101 GTKVEIK

In addition to the epitope described in section 4 above, K^{39}PGQAPRTLI has 80% sequence identity to KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). This peptide is reported to have an IC50 >100,000 nM against all the HLA-DR alleles for which it was tested. LC5c germinality index = 79% with IGKV3-11-02_IGKJ4-01 [VκIII-L6]. A schematic of all light chain mutations is shown in Figure 15.

b) Engineered heavy chain sequences

HC1a contains eight mutations derived from the 4D humanization method to the closest human germline sequence. HC1b contains six mutations derived from the 4D humanization method to the 2nd closest germline sequence. HC2a contains four additional mutations when compared to HC1a to address unwanted sequence motifs. HC2b only addresses the deamidation site in CDR1 ($N^{31}G$). HC3 contains the humanizing mutations from HC1a with an additional five stabilizing mutations. HC4 contains humanizing mutations from HC1a, stabilizing mutations from HC3 and the mutations addressing problematic motifs from HC2a. CDRs and vernier zones are in italics, vernier

residues are underlined, humanizing mutations are in boldface, problematic motifs are in double strikethrough and stabilizing mutations are shown in lower case.

HC1a (SEQ ID NO: 82):

1 E*M*TLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVT*GDSMT NGYWN*WIRKF PGKALE*YMGY*
51 *ITYSGSTYYN* PSLKGR*ISI*T *R*N*T*SKNQ*Y*YL TLSSVTTVDT ATYYC*ARWHY*
101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC1a in IEDB database. HC1a germinality index = 68% with IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC1b (SEQ ID NO: 83):

1 E*M*QLQESGP**G** LVKPS**E**TLSL TCSVT*GDSMT NGYWN*WIRKF PG**K**GLE*YMGY*
51 *ITYSGSTYYN* PSLKGR*ISI*T *R*N*T*SKNQ*Y*YL **K**LSSVTT**A**DT ATYYC*ARWHY*
101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC1b in IEDB database. HC1b germinality index = 73% with IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC2a (SEQ ID NO: 84):

1 E*M*TLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVT*G~~E~~SMT ~~Q~~GYWN*WIRKF PGKALE*YMGY*
51 *ITYSGSTYYN* PSLKGR*ISI*T *R~~Q~~T*SKNQ*Y*YL TLSSVTTV~~E~~T ATYYC*ARWHY*
101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC2a in IEDB database. HC2a germinality index = 67% with IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC2b (SEQ ID NO: 85):

1 E*M*TLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVT*GDSMT ~~Q~~GYWN*WIRKF PGKALE*YMGY*
51 *ITYSGSTYYN* PSLKGR*ISI*T *R*N*T*SKNQ*Y*YL TLSSVTTVDT ATYYC*ARWHY*
101 *GSPYYFDYW*G QGTTLTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC2b in IEDB database. HC2b germinality index = 67% with IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC3 (SEQ ID NO: 86):

1 q*M*TLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVs*GDSMT NGYWN*WIRqF PGKALE*YMGY*
51 *ITYSGSTYYN* PSLKGR*IsI*T *R*d*T*SKNQ*Y*YL TLSSVTTVDT ATYYC*ARWHY*

101 *GSPYYFDYWG* QGTTLTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC3 in IEDB database. HC3 germinality index = 72% with IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC4 (SEQ ID NO: 87):

1 q*M*TLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVsG~~E~~S*MT* ~~Q~~G*YWN*WIRqF PGKALE*YMGY*

51 *ITYSGSTYYN* PSLKGR*IIT* *R*~~Q~~*T*SKNQ*Y*YL TLSSVTTV~~E~~T ATYYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYWG* QGTTLTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC4 in IEDB database. HC4 germinality index = 70% with IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02.

HC5a (SEQ ID NO: 88):

1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVS*GDSMT* *NGYWN*WIRQP PGKGLE*YMGY*

51 *ITYSGSTYYN* PSLKSR*IT*I*S* *R*N*T*SKNQ*Y*SL KLSSVTAADT AVYYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYWG* QGTLVTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC5a in IEDB database. HC5a germinality index = 84% with IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5b (SEQ ID NO: 89):

1 Q*M*QLQESGPG LVKPSETLSL TCTVS*GDSMT* *NGYWN*WIRQP PGKGLE*YMGY*

51 *ITYSGSTYYN* PSLKSR*IT*I*S* *R*D*T*SKNQ*Y*SL KLSSVTAADT AVYYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYWG* QGTLVTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC5b in IEDB database. HC5b germinality index = 84% with IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5c (SEQ ID NO: 90):

1 Q*M*QLQQSGPG LVKPSQTLSL TCAISG*DSMT* *NGYWN*WIRQS PSRGLE*YMGY*

51 *ITYSGSTYYA* VSVKSR*IT*I*N* *R*D*T*SKNQ*Y*SL QLSSVTPEDT AVYYC*AR*WHY

101 *GSPYYFDYWG* QGTLVTVSS

No human epitopes were identified for sequence HC5c in IEDB database. HC5c germinality index = 78% with IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 [VH6 6-01].

A schematic of all heavy chain mutations is shown in Figure 16.

c) Combinations of Heavy and Light Chain Variant Sequences

For grafting, three versions for the light chain (LC5a, LC5b, LC5c) and three versions of the heavy chain (HC5a, HC5b, HC5c) were created. LC5a contains 16 mutations derived from grafting to the closest human germline sequence and retaining the murine CDR and most of the murine Vernier zone residues. Two murine Vernier residues, T46 and N69 are not present in any human germline sequence and were conservatively mutated. LC5b contains 14 mutations derived from grafting to the closest human germline sequence and retained the murine CDR and all the murine Vernier zone residues. LC5c contains 22 mutations derived from grafting to the second closest human germline sequence and retained the murine CDR and all the murine Vernier zone residues.

HC5a contains 20 mutations derived from grafting to the closest human germline sequence and retained the murine CDR and most of the murine Vernier zone residues with the exception of M2V. Met occurs with a very low propensity at this position in human germline sequences. HC5b contains 20 mutations derived from grafting to the closest human germline sequence and retained the murine CDR and all the murine Vernier zone residues. HC5c contains 23 mutations derived from grafting to the second closest human germline sequence and retained the murine CDR and all the murine Vernier zone residues.

Ten combinations were prepared in total (summarized in Table 19):

- LC1a x HC1a (mutations addressing 4D humanization based on the closest germline sequence)
- LC1b x HC1b (mutations addressing 4D humanization based on the 2nd closest germline sequence)
- LC2 x HC2a (mutations addressing 4D humanization and unwanted sequences)
- LC2 x HC2b (mutations addressing 4D humanization and unwanted sequences)
- LC1a x HC2b (mutations addressing 4D humanization and unwanted sequences)
- LC3 x HC3 (mutations addressing 4D humanization and stabilization)
- LC4 x HC4 (mutations addressing 4D humanizing, unwanted sequences and stabilization)
- LC5a x HC5a (mutations addressing humanization by grafting retaining CDRs and incorporating 3 conservative Vernier modifications)
- LC5b x HC5b (mutations addressing humanization by grafting retaining CDRs and Vernier regions)
- LC5c x HC5c (mutations addressing humanization by grafting retaining CDRs and Vernier regions)

Table 19: Summary of the Ten LC x HC Combinations

	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H+UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H+UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
HC1a (H)	X(1)							
HC1b (H)		X(2)						
HC2a (H+UM)			X(3) Low					
HC2b (H+UM)	X(4)		X(5)					
HC3 (H+S)			X(11)	X(6)	X (12)			
HC4 (H+UM+S)					X(7) Low			
HC5a (G)						X(8)		
HC5b (G)			X(13)		X(14)		X(9)	
HC5c (G)								X(10) Low

H=humanizing; UM= unwanted motifs; S=stabilizing; G=grafting
Low=low expression levels
Number within the () indicates the variant number; note: variants 11 – 14 were added following characterization of the original ten variants (variants 1-10)

Table 21: Mutations of the eight LC variants of the anti-PAI1 A44 antibody

LC Sequential Numbering	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H-UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H-UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
Asp1								Glu
Lys3						Gln	Gln	Val
Ser9								Ala
Ser10								Thr
Met11	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu

Tyr12	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Ala13		Val						Leu
Leu15	Val	Pro	Val	Val	Val	Val	Val	Pro
Glu17	Asp	Gln	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	
Arg18		Thr						
Val19								Ala
Ile21								Leu
Thr22								Ser
Lys42		Gln						Gln
Ser43						Ala	Ala	Ala
Lys45								Arg
Thr46						Leu		
Asn52			Gln		Gln			
Asp56			Glu		Glu			
Val58								Ile
Ser60								Ala
Gln69						Thr		
Ser72						Thr	Thr	Thr
Leu73						Phe	Phe	
Glu79	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	

Tyr80	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Glu81		Met						
Met83	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe
Gly84				Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Ile85				Thr	Thr	Thr	Thr	Val
Leu104						Val	Val	Val
Glu105		Thr						
Number of mutations	7	12	9	9	11	16	14	22
H=humanizing; UM= unwanted motifs; S=stabilizing; G=grafting								

Table 22: Mutations of the nine HC variants of the anti-PA11 A44 antibody

HC Sequential Numbering	HC1a (H)	HC1b (H)	HC2a (H-UM)	HC2b (H-UM)	HC3 (H+S)	HC4 (H-UM+S)	HC5a (G)	HC5b (G)	HC5c (G)
Glu1					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Met2							Val		
Gln3	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Glu5	Lys		Lys	Lys	Lys	Lys			Gln
Ser10	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly
Ser15	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			

Gln16		Glu					Glu	Glu	
Ser23							Thr	Thr	Ala
Val24									Ile
Thr25					Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Asp27			Glu			Glu			
Asn31			Gln	Gln		Gln			
Lys39					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Phe40							Pro	Pro	Ser
Gly42									Ser
Asn43	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg
Lys44	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly
Asn60									Ala
Pro61									Val
Leu63									Val
Gly65							Ser	Ser	Ser
Ser68					Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
Thr70							Ser	Ser	Asn
Asn72			Gln		Asp	Gln		Asp	Asp
Tyr79							Ser	Ser	Ser
Gln81	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Lys	

Thr87							Ala	Ala	Pro
Glu88	Val	Ala	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	
Asp89			Glu			Glu			
Thr92							Val	Val	Val
Thr114							Leu	Leu	Leu
Leu115							Val	Val	Val
Number of mutations	8	6	12	9	13	16	20	20	23
H=humanizing; UM= unwanted motifs; S=stabilizing; G=grafting									

In summary, ten variants were generated during the humanization process. These variants were expressed and characterized in several *in vitro* assays as described below.

7) Characterization of Humanization Variants

Based on the in silico modeling presented in the above example, ten variants were generated (variants 1 – 8 by 4D humanization and variants 9 – 10 by CDR grafting; variants 3 and 10 were created on the second closest germline). The variable region of the light chain and heavy chain DNA of humanized A44 were prepared for HEK293 expression. Proteins were generated after cloning the corresponding DNA into pXL plasmids (New England Biolabs; NheI/Eco47III for the HC, NheI/BsiWI for the LC). Humanized sequences were codon optimized for HEK expression and gene synthesized by GeneArt (subsidiary of Life Technologies). The resulting plasmids were co-transfected and transiently expressed in FreeStyle™293 Expression System (Invitrogen, Cat#K9000-01). Variants 3 and 10 were very poorly expressed and were not further pursued. All other variants were expressed and purified using Protein A columns. Analytical gels showed partial glycosylation (about 5 – 10%) of the light chains in variants 6 and 9 and heavy chains in variants 5 and 7 (data not shown). The remaining eight variants were tested in the chromogenic assay using hPAI and plasmin generation assay in human stellate cells using human glycosylated PAI. Results are shown in Table 23.

Table 23: Characterization of humanization variants in plasmin generation and chromogenic assay

	Plasminogen Activation		Chromogenic Assay
mAb	**IC50 (nM)**	**Y50%**	**IC50 (nM)**
A44	3.17	45.99	0.44
A44-hv1	3.12	44.99	0.49
A44-hv2	Not determined	Not determined	0.60
A44-hv4	Inactive	26.00	0.52
A44-hv5	Not determined	Not determined	1.11
A44-hv6	1.78	56.94	0.82
A44-hv7	Not determined	Not determined	0.59
A44-hv8	Inactive	11.00	0.76
A44-hv9	1.9	46.53	0.86

Variants 6 and 9 showed the best potency in the plasmin generation assay but had partial (5 – 10%) glycosylation in the light chain. Based on these results, new variants 11-14 were produced using combinations of heavy chains from variants 6 and 9 and light chains from variants 5 and 7. Table 24 summarizes all the variants created.

Table 24: Humanization variants

Variant #	**Description**	**SEQ ID NOs**
A44-hv1	LC1a x HC1a	109
A44-hv2	LC1b x HC1b	110
A44-hv3	LC2 x HC2a	111
A44-hv4	LC1a x HC2b	112
A44-hv5	LC2 x HC2b	113
A44-hv6	LC3 x HC3	114
A44-hv7	LC4 x HC4	115
A44-hv8	LC5a x HC5a	116
A44-hv9	LC5b x HC5b	117
A44-hv10	LC5c x HC5c	118
A44-hv11	LC2 x HC3	119
A44-hv12	LC4 X HC3	120

A44-hv13	LC2 x HC5b	121
A44-hv14	LC4 x HC5b	122

Table 25: DNA Sequence Humanization variants

	Gene	Protein
HC1a	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 123)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVTGDSMTNGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL TLSSVTTVDTATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 82)
HC1b	GAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTG GTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCA GCGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTG GAACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGGCCTC GAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCA CCTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAG CATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTAC CTGAAGCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 124)	EMQLQESGPGLVKPSETLSL TCSVTGDSMTNGYWNWIRK FPGKGLEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL KLSSVTTADTATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 83)
HC2a	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 125)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVTGESMTQGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRQTSKNQYYL TLSSVTTVETATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 84)
HC2b	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGACAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 126)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVTGDSMTQGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL TLSSVTTVDTATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 85)
HC3	CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCACC ATCACCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGAGCAGCGTG	QMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVSGDSMTNGYWNWIRQ FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRITITRDTSKNQYYL TLSSVTTVDTATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 86)

	(SEQ ID NO: 127)	
HC4	CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGTCCGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGGGCCGGATCACC ATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 128)	QMTLKESGPTLVKPTQTLSL TCSVSGESMTQGYWNWIRQ FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRITITRQTSKNQYYL TLSSVTTVETATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 87)
HC5a	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCAC CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCAGCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACAGC CTGAAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 129)	QVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGDSMTNGYWNWIRQ PPGKGLEYMGYITYSGSTYY NPSLKSRITISRNTSKNQYSL KLSSVTAADTAVYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 88)
HC5b	CAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCAC CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACAGC CTGAAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 130)	QMQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGDSMTNGYWNWIRQ PPGKGLEYMGYITYSGSTYY NPSLKSRITISRDTSKNQYSL KLSSVTAADTAVYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 89)
HC5c	CAGATGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGC CATCAGCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGAGCCCCAGCAGAGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGGATCACC ATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACAGC CTGCAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 131)	QMQLQQSGPGLVKPSQTLSL TCAISGDSMTNGYWNWIRQ SPSRGLEYMGYITYSGSTYY AVSVKSRITINRDTSKNQYSL QLSSVTPEDTAVYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 90)
LC1a	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO: 132)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KSPKTLIYRANRSVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLQPEDL GIYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 91)
LC1b	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCGTGT CCGTGTCTCCTGGCCAGACCGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACGG CGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGGC	DIKMTQSPSSVSVSPGQTVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG QSPKTLIYRANRSVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLQAMD EGIYYCLQYDEFPPTFGGGT KLTIK

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
19 February 2015 (19.02.2015)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2015/023752 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/38 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2014/050896

(22) International Filing Date:
13 August 2014 (13.08.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/865,451 13 August 2013 (13.08.2013) US
14305757.8 22 May 2014 (22.05.2014) EP

(71) Applicant: **SANOFI** [FR/FR]; 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR).

(72) Inventors; and
(71) Applicants : **PRITSKER, Alla** [US/US]; c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, NJ 08807 (US). **GRAILHE, Patrick** [FR/FR]; c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR). **RAK, Alexey** [DE/FR]; c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR). **MATHIEU, Magali** [FR/FR]; c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR). **MORGAN, Christopher Ryan** [US/US]; c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, NJ 08807 (US). **BAURIN, Nicolas** [FR/FR]; c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR). **POIRER, Bruno** [FR/FR]; c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR). **DAVEU, Cyril** [FR/FR]; 5 rue Dupont des Loges, F-75007 Paris (FR). **DUFFIEUX, Francis** [FR/FR]; c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR). **LI, Han** [US/US]; 388 Twig Lane, Yardley, PA 19067 (US). **KOMINOS, Dorothea** [US/US]; 99 Rolling Hill Drive, Millington, NJ 07946 (US). **JANIAK, Philip** [FR/FR]; c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris (FR).

(74) Agent: **DEGIULIO, James V.**; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP, 300 South Wacker Drive, Suite 3100, Chicago, IL 60606 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) **Title**: ANTIBODIES TO PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1) AND USES THEREOF

(57) **Abstract**: The invention provides antibodies that specifically bind to Plasminogen Activator inhibitor type-1 (PAI-1), The invention also provides pharmaceutical compositions, as well as nucleic acids encoding anti-PAI-1 antibodies, recombinant expression vectors and host cells for making such antibodies, or fragments thereof. Methods of using antibodies to modulate PAI-1 activity or detect PAI-1, either *in vitro* or *in vivo*, are also provided. The disclosure further provides methods of making antibodies that specifically bind to PAI-1 in the active conformational state.

WO 2015/023752 A1

ANTIBODIES TO PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1) AND USES THEREOF

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 61/865,451, filed August 13, 2013, and European Patent Application No. 14305757.8, filed May 22, 2014, which are incorporated herein by reference in their entireties.

BACKGROUND

Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1) is the main inhibitor of tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase-type plasminogen activator (uPA), the key serine proteases responsible for plasmin generation. PAI-1 regulates fibrinolysis by inhibiting plasminogen activation in the vascular compartment. Fibrinolysis is a tightly coordinated process for degrading fibrin clots formed by activation of the coagulation cascade. Dysregulation of the coagulation/fibrinolysis balance leads to abnormal haemostasis events like bleeding or thrombotic diseases. PAI-1 is also a key regulator of plasminogen activation in the pericellular compartment (intravascular and tissular) where receptor bound plasminogen is activated mainly by urokinase bound to the urokinase receptor (uPAR). By inhibiting pericellular proteolysis, PAI-1 regulates numerous cellular functions like extracellular matrix (ECM) degradation, growth factors activation and release from ECM, matrix metalloproteinases (MMP) activation and cellular apoptosis. Recently, protease-independent effects of PAI-1 have been identified through its interaction with cofactors (like vitronectin, heparin, glycosaminoglycan), uPAR-urokinase complexes or cellular receptors (LRP: low-density Lipoprotein Receptor-related Protein) or integrins affecting cell functions like adhesion/de-adhesion, migration, proliferation and intracellular bioactivity. By these cellular mechanisms and anti-fibrinolytic effects, a pathogenic role of PAI-1 has been established in tumor growth and metastasis, fibrosis, acute myocardial infarction and metabolic disorders like atherosclerosis, obesity and diabetes.

The Human SERPINE1 (PAI-1) gene is localized to chromosome 7, consists of eight introns and nine exons, and has a size of 12,169 b (Klinger, K.W. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8548, 1987). PAI-1 is a single chain glycoprotein of approximately 50 kDa (379 amino acids) from the SERPIN (serine protease inhibitor) superfamily that is synthesized in the active conformation but spontaneously becomes latent in the absence of vitronectin (Vn). Vitronectin, the main cofactor of PAI-1, stabilizes the active conformation with the Reactive Center Loop (RCL) which is approximately 20 amino acids that are exposed on the surface. The mechanism of inhibition of PAI-1's two main targets (tPA and uPA) is a suicide inhibition. The RCL region of PAI-1 bears the bait peptide bond (R346-M347, also called P1-P'1), which bears the cleavage site for this serine protease. A Michaelis complex with tPA or uPA forms first, then the catalytic triad reacts with the bait peptide

bond to form an acyl-enzyme complex that, after cleavage of the P1-P'1 peptide bond, induces strong conformation changes. The conformational changes cause insertion of the cleaved RCL into a β-strand with the protease staying covalently bound as an acyl enzyme with PAI-1. Under non-physiological circumstances, hydrolysis of this acyl-enzyme complex may induce release of the cleaved PAI-1 and free active protease (Blouse *et al.*, *Biochemistry*, 48:1723, 2009).

PAI-1 circulates in blood at highly variable levels (nM range) and in excess over t-PA or uPA concentrations. PAI-1 exhibits structural flexibility and can be found in one of three conformations: (1) a latent conformation, (2) an active conformation, or (3) a substrate conformation (*see* Figure 1). PAI-1 is mainly found as a noncovalent complex with vitronectin (Kd ~1 nM) that decreases latency transition by 1.5 to 3 fold. Latent, cleaved or complexed PAI-1 affinity for vitronectin is significantly reduced. Matrix bound vitronectin also localizes with PAI-1 in the pericellular space. Endothelial cells, monocytes, macrophages and vascular smooth muscle cells synthesize this PAI-1 which then can be stored in large amounts under latent form by platelets (in the α granule). PAI-1 is a fast and specific inhibitor (with the second order rate constant of 10^6 to 10^7 $M^{-1}s^{-1}$) of tPA and uPA in solution, but inactive against protease bound either to fibrin or their cellular receptors. Other proteases like thrombin, plasmin, activated Protein C can be also inhibited by PAI-1 but less efficiently.

Several 3D structures of human PAI-1 have been solved since the first one described in 1992 (Mottonen *et al.*, *Nature* 355:270, 1992) in the latent conformation. These 3D structures include mutant forms of PAI-1 in the substrate (Aertgeerts *et al.*, *Proteins* 23:118, 1995), stabilized active conformation (Sharp *et al.*, *Structure* 7:111, 1999), PAI complexed to Vitronectin-somatomedin B domain (Zhou *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 10:541, 2003) or with inhibiting pentapeptide from the RCL loop (Xue *et al.*, *Structure* 6:627, 1998). More recently, mouse PAI-1 structure in latent conformation was elucidated by Dewilde *et al.* (*J Struct. Biol.* 171:95, 2010) and revealed differences with human PAI-1 in the RCL position, gate region and position of α-helix A. Structure/function relationships in PAI-1 have been studied by using more than 600 mutant proteins (reviewed by De Taeye *et al.*, *Thromb. Haemost.* 92:898, 2004) to localize domains involved in the various activities of this multifunctional serpin.

Since PAI-1 can be synthesized by almost every cell type including hepatocyte, adipocyte, mesangial cell, fibroblast, myofibroblast, and epithelial cell, its expression greatly varies under physiological (*e.g.*, circadian variation of plasma PAI-1 level) and pathological conditions (*e.g.*, obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, infection, inflammatory diseases, cancer). PAI-1 is considered to be an acute phase protein. Transcriptional regulation of PAI-1 mRNA expression is induced by several cytokines and growth factors (*e.g.*, TGFβ, TNFα, EGF, FGF, Insulin, angiotensin II & IV), hormones (*e.g.*, aldosterone, glucocorticoids, PMA, high glucose) and stress factors (*e.g.*, hypoxia, reactive oxygen species, lipopolysaccharides).

Moreover, a polymorphism in the promoter (position - 675) of the PAI-1 gene affects expression level. The 4G allele increases PAI-1 level and the 4G/4G variant (occurring in around 25% of the population) induces an increase of approximately 25% of plasma PAI-1 level in comparison to 5G/5G (25 % occurrence and 4G/5G 50% occurrence). The 4G/4G polymorphism has been linked to myocardial infarction (Dawson *et al., Arterioscler Thromb.* 11:183, 1991), a specific type of pulmonary fibrosis (idiopathic interstitial pneumonia) (Kim *et al., Mol Med.* 9:52, 2003) and the 4G/4G genotype donor group is an independent risk factor for kidney graft loss due to Interstitial Fibrosis &Tubular Atrophy (Rerolle *et al., Nephrol. Dial. Transplant* 23:3325, 2008).

Several pathogenic roles have been attributed to PAI-1 in thrombotic diseases such as arterial and venous thrombosis, acute myocardial infarction, and atherosclerosis. Its involvement in metabolic disorders like insulin resistance syndrome and obesity is well recognized. PAI-1 is also known as a profibrotic factor for several organs and has been shown to be over-expressed in fibrotic tissues (*i.e.*, liver, lung, kidney, heart, abdominal adhesions, skin: scar or scleroderma) (reviewed by Ghosh and Vaughan, *J. Cell Physiol.* 227:493, 2012). PAI-1 knock-out (KO) mice are protected from fibrosis in different models, such as liver (bile duct ligation or xenobiotic), kidney (unilateral ureteral obstruction model (UUO)), lung (bleomycin inhalation) (Bauman *et al., J. Clin. Invest.* 120:1950, 2010; Hattori *et al., Am. J. Pathol.* 164:1091, 2004; Chuang-Tsai *et al., Am. J. Pathol.*163:445, 2003) whereas in heart this deletion is protected from induced fibrosis (Takeshita *et al., AM. J. Pathol.* 164:449, 2004) but prone to age-dependent cardiac selective fibrosis (Moriwaki *et al., Cric. Res.* 95:637, 2004). Down-regulation of PAI-1 expression by siRNA (Senoo *et al., Thorax* 65:334, 2010) or inhibition by chemical compounds (Izuhara *et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:672, 2008; Huang *et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46:87, 2012) have been reported to decrease lung fibrosis whereas PAI-1 overexpression of wild type (Eitzman *et al., J. Clin. Invest.* 97:232, 1996) or a PAI-1 mutant retaining only vitronectin binding but not tPA inhibitor function exacerbates lung fibrosis (Courey *et al., Blood* 118:2313, 2011).

Bile duct ligation (BDL) liver fibrosis is attenuated by antibody neutralizing PAI-1 (U.S. Patent No. 7,771,720) whereas down-regulation by siRNA attenuates BDL and xenobiotic induced liver fibrosis (Hu *et al., J. Hepatol.* 51:102, 2009). PAI-1 KO mice were protected from cholestatic-induced liver damage and fibrosis in BDL (Bergheim *et al., J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:592, 2006; Wang *et al., FEBS Lett.* 581:3098, 2007; Wang *et al., Hepatology* 42:1099, 2005) and from angiotensin II induced liver fibrosis (Beier et *al., Arch. Bioch. Biophys.* 510:19, 2011).

PAI-1 KO mice are protected from renal fibrosis in the UUO model (Oda *et al., Kidney Int.* 60, 587, 2001), in diabetic nephropathy (Nicholas *et al., Kidney Int.* 67:1297, 2005) and in angiotensin II induced nephropathy (Knier *et al., J. Hypertens.* 29:1602, 2011; for reviews see Ma *et al. Frontiers Biosci.* 14:2028, 2009 and Eddy A.A. *Thromb. Haemost.* 101:656, 2009). In contrast,

PAI-1 over expressing mice display more severe fibrosis and increased macrophage recruitment following UUO (Matsuo *et al., Kidney Int.* 67: 2221, 2005; Bergheim *et al., J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:592, 2006). Non-inhibitory PAI-1 mutant (PAI-1 R) has been shown to protect mice from the development of fibrosis in experimental glomerulonephritis (thy1) in rat by decreasing urinary protein expression and glomerular matrix accumulation (Huang *et al., Kidney Int.* 70:515, 2006). Peptides blocking PAI-1 inhibit collagen 3, 4 and fibronectin accumulation in UUO mice (Gonzalez *et al., Exp. Biol. Med.* 234:1511, 2009).

PAI-1, as a target for numerous pathologies, has been the focus of intensive research to inhibit its activity or to regulate its expression for the last 20 years. Chemical compounds (Suzuki *et al., Expert Opin. Investig. Drugs* 20:255, 2011), monoclonal antibodies (Gils and Declerk, *Thromb Haemost*; 91:425, 2004), peptides, mutants (Cale and Lawrence, *Curr. Drug Targets* 8:971, 2007), siRNA or anti-sense RNA have been designed to inhibit its various function or to regulate its expression. However, despite the intensive research, the problem of developing a therapeutically effective modulator of PAI-1 still remains to be solved. Accordingly, there is a need in the art for novel agents that inhibit the PAI-1 activity for use in the treatment of PAI-1-mediated human pathologies.

SUMMARY OF THE DISCLOSURE

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 34), CDR2 (SEQ ID NO: 33), and CDR3 (SEQ ID NO: 32) of SEQ ID NO: 6, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO: 36), and CDR3 (SEQ ID NO: 35) of SEQ ID NO: 7. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 6, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 7. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 6, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 7. All % identity approximations indicate the minimum % identity; higher % identity than the recited values are also encompassed by the disclosure.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 34, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 36, and a light chain

CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 6, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 7.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 21), and CDR3 (SEQ ID NO: 20) of SEQ ID NO: 2, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 24), and CDR3 (SEQ ID NO: 23) of SEQ ID NO: 3. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 2, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 3. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 2, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 3.

In an additional aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 22, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 21, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 20; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 25, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 24, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 23. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 26, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 3.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 28), CDR2 (SEQ ID NO: 27), and CDR3 (SEQ ID NO: 26) of SEQ ID NO: 4, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 31), CDR2 (SEQ ID NO: 30), and CDR3 (SEQ ID NO: 29) of SEQ ID NO: 5. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 4, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 5. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 4, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 5.

In an additional aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 28, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 27, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 26; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 31, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 30, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 29. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 4, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 5.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 40), CDR2 (SEQ ID NO: 39), and CDR3 (SEQ ID NO: 38) of SEQ ID NO: 8, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 43), CDR2 (SEQ ID NO: 42), and CDR3 (SEQ ID NO: 41) of SEQ ID NO: 9. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 8, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 9. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 8, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 9.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 40, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 39, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 38; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 43, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 42, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 41. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 8, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 9.

In one aspect, disclosed herein is An isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 52), CDR2 (SEQ ID NO: 51), and CDR3 (SEQ ID NO: 50) of SEQ ID NO: 10, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 55), CDR2 (SEQ ID NO: 54), and

CDR3 (SEQ ID NO: 53) of SEQ ID NO: 11. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 10, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 11. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 10, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 11.

In an additional aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 52, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 51, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 50; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 55, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 54, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 53. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 10, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 11.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 58), CDR2 (SEQ ID NO: 57), and CDR3 (SEQ ID NO: 56) of SEQ ID NO: 12, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 61), CDR2 (SEQ ID NO: 60), and CDR3 (SEQ ID NO: 59) of SEQ ID NO: 13. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 12, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 13. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 12, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 13.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 58, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 57, and heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 56; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 61, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 60, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 59. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 12, and the antibody light chain

comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 13.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 64), CDR2 (SEQ ID NO: 63), and CDR3 (SEQ ID NO: 62) of SEQ ID NO: 14, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 67), CDR2 (SEQ ID NO: 66), and CDR3 (SEQ ID NO: 65) of SEQ ID NO: 15. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 14, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 15. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 14, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 15.

In an additional aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 64, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 63, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 62; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 67, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 66, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 65. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 14, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 15.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 70), CDR2 (SEQ ID NO: 69), and CDR3 (SEQ ID NO: 68) of SEQ ID NO: 16, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 73), CDR2 (SEQ ID NO: 72), and CDR3 (SEQ ID NO: 71) of SEQ ID NO: 17.

In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 16, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 17. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 16, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 17.

In an additional aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds

specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 70, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 69, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 68; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 73, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 72, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 71. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 16, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 17.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to human Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 46), CDR2 (SEQ ID NO: 45), and CDR3 (SEQ ID NO: 44) of SEQ ID NO: 80, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO: 48), and CDR3 (SEQ ID NO: 47) of SEQ ID NO: 81.

In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 80, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 81. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 80, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 81.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 46, a heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 45, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 44; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 49, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 48, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 47. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 80, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 81.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region, said heavy chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 76), CDR2 (SEQ ID NO: 75), and CDR3 (SEQ ID NO: 74) of SEQ ID NO: 18, and a light chain variable region, said light chain variable region comprising CDR1 (SEQ ID NO: 79), CDR2 (SEQ ID NO: 78), and CDR3

(SEQ ID NO: 77) of SEQ ID 19. In an additional aspect the heavy chain comprises a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 18, and the light chain comprises a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 19. In a further aspect, heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 18, and the light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to SEQ ID NO: 19.

An isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 76, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 75, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 74; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 79, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 78, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 77. In certain aspects, the antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 18, and the antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 19.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 33, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 146, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 145, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 147, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 36, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 147, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 145, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 146, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 145, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 34, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 145, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

In an additional aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds to essentially the same epitope on PAI-1 as an isolated monoclonal antibody, comprising a heavy chain variable region, wherein the heavy chain variable region comprises CDR1 (SEQ ID NO: 34), CDR2 (SEQ ID NO: 33), and CDR3 (SEQ ID NO: 32) of SEQ ID NO: 6, and a light chain variable region, wherein the light chain variable region comprises CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO: 36), and CDR3 (SEQ ID NO: 35) of SEQ ID NO: 7.

In a certain aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, comprising: (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 76, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 75, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 74; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 79, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 78, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 77.

In one aspect, disclosed herein is a humanized monoclonal antibody that binds specifically to human PAI-1, wherein the antibody comprises: (a) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 82, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 91, or an antigen-binding fragment thereof; (b) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 83, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 92, or an antigen-binding fragment thereof; (c) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 84, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof; (d) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 85, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising

SEQ ID NO: 91, or an antigen-binding fragment thereof; (e) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 85, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof; (f) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 94, or an antigen-binding fragment thereof; (g) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 87, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof; (h) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 88, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 96, or an antigen-binding fragment thereof; (i) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 97, or an antigen-binding fragment thereof; (j) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 90, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 98, or an antigen-binding fragment thereof; (k) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof; (l) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof; (m) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93, or an antigen-binding fragment thereof; or (n) a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 89, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 95, or an antigen-binding fragment thereof. In a further aspect, the humanized heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to any of the previously disclosed human heavy chain variable regions, and the humanized light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to any of the previously disclosed human light chain variable regions.

In one aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 comprising: (a) a heavy chain framework region and a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 86, and (b) a light chain framework region and a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 93. In certain aspects, the isolated monoclonal heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to

the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 86, and the isolated monoclonal antibody light chain comprises light chain framework regions that are 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 93. In certain other aspects, the isolated monoclonal antibody heavy chain comprises heavy chain framework regions that are 95% identical to the heavy chain framework regions of SEQ ID NO: 86, and the isolated monoclonal antibody light chain comprises light chain framework regions that are 95% identical to the framework regions of SEQ ID NO: 93.

In another aspect, disclosed herein is a humanized monoclonal antibody that binds specifically to human PAI-1, wherein the antibody comprises a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 154, or an antigen-binding fragment thereof; and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 153, or an antigen-binding fragment thereof. In another aspect, disclosed herein is a humanized monoclonal antibody that binds specifically to human PAI-1, wherein the antibody comprises a heavy chain having a heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 155, or an antigen-binding fragment thereof, and a light chain having a light chain variable region comprising SEQ ID NO: 153, or an antigen-binding fragment thereof. In a further aspect, the humanized heavy chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to any of the previously disclosed human heavy chain variable regions, and the humanized light chain variable region is 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to any of the previously disclosed human light chain variable regions.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, wherein the antibody binds a polypeptide comprising SEQ ID NO: 158. In another embodiment, the isolate monoclonal antibody binds a fragment of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 158. In yet another embodiment, the isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 binds a polypeptide comprising SEQ ID NO: 156 and/or SEQ ID NO: 158. In another embodiment, the isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 binds a polypeptide comprising SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, and/or SEQ ID NO: 157. In still another embodiment, the isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 comprises specific binding affinity for residues 160, 262, 296-297, 300-307, and/or 310-316 of SEQ ID NO: 1. In certain embodiments, the isolated monoclonal antibody disclosed herein interacts with at least residues 311, 312, and 313 (D-Q-E) of SEQ ID NO: 1. In certain embodiments, the PAI-1 bound by the antibody is human PAI-1. In other embodiments, the PAI-1 bound by the antibody is the active form of human PAI-1.

In other embodiments, the isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 disclosed herein binds a polypeptide comprising SEQ ID NO: 161. In still other embodiments, the

isolated monoclonal antibody binds a polypeptide comprising SEQ ID NO: 159 and/or SEQ ID NO: 161. In still other embodiments, the isolated monoclonal antibody binds a polypeptide comprising SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, and/or SEQ ID NO: 161. In still another embodiment, the isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1 comprises specific binding affinity for residues 44-64 and/or residues 307-321 of cyno-PAI-1 (SEQ ID NO: 162). In certain embodiments, the PAI-1 bound by the antibody is cyno-PAI-1. In other embodiments, the PAI-1 bound by the antibody is the latent form of cyno-PAI-1.

In a further aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that competitively inhibits binding of any of the disclosed antibodies to PAI-1. In an embodiment, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that competes for binding and/or competitively inhibits binding with any of the isolated monoclonal antibodies disclosed herein. In certain embodiments, the isolated monoclonal antibody competes or competitively inhibits binding to human PAI-1. In certain embodiments, the isolated monoclonal antibody competes or competitively inhibits binding to a polypeptide comprising SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, and/or SEQ ID NO: 158. In another embodiment, the isolated monoclonal antibody competes or competitively inhibits binding to a polypeptide comprising SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, and/or SEQ ID NO: 161. In an embodiment, the isolated antibody competes for binding to a polypeptide comprising SEQ ID NO: 156, 157, and/or 158 with an isolated monoclonal antibody comprising (a) heavy chain framework regions, a heavy chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 34, heavy chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 33, and a heavy chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 32; and (b) light chain framework regions, a light chain CDR1 region comprising SEQ ID NO: 37, a light chain CDR2 region comprising SEQ ID NO: 145, and a light chain CDR3 region comprising SEQ ID NO: 35.

In another aspect, disclosed herein are nucleotides encoding any of the isolated monoclonal antibodies disclosed herein.

In one aspect, disclosed herein is a method of treating a condition caused by increased expression of PAI-1 or increased sensitivity to PAI-1 comprising administering to a patient or other subject orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody.

In one aspect, disclosed herein is a method restoring plasmin generation comprising administering to a patient or other subject in need thereof orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody. Parenteral administration disclosed herein includes intravenous, drip, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, rectal or vaginal, intravenous, intraarterial, subcutaneous, and intramuscular forms of parenteral administration. In some embodiments, the administration to a

patient or other subject comprises multiple administrations. In another aspect, the method of restoring plasmin generation facilitates therapeutic treatment of a condition comprising increased levels of fibrotic tissue. In some aspects, the condition is characterized by fibrosis. In some aspects, the condition is fibrosis, skin fibrosis, systemic sclerosis, lung fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, interstitial lung disease, and chronic lung disease. In other aspects, the plasmin generation facilitates therapeutic treatment of liver fibrosis, kidney fibrosis, including chronic kidney disease, thrombosis, venous and arterial thrombosis, deep vein thrombosis, peripheral limb ischemia, disseminated intravascular coagulation thrombosis, acute ischemic stroke with and without thrombolysis, or stent restenosis.

In another aspect, disclosed herein is the use of a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody for the manufacture of a medicament for treating a condition caused by increased expression of PAI-1 or increased sensitivity to PAI-1 comprising administering to a patient or other subject orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically.

In one aspect, the medicament is for treating a condition comprising increased levels of fibrotic tissue. In some aspects, the condition is characterized by fibrosis. In some aspects, the condition is fibrosis, skin fibrosis, systemic sclerosis, lung fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, interstitial lung disease, and chronic lung disease. In other aspects, the medicament is for treating a condition comprising liver fibrosis, kidney fibrosis, including chronic kidney disease, thrombosis, venous and arterial thrombosis, deep vein thrombosis, peripheral limb ischemia, disseminated intravascular coagulation thrombosis, acute ischemic stroke with and without thrombolysis, or stent restenosis.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, wherein the antibody inhibits lung fibrosis. In certain embodiments, the antibody inhibits fibrosis in the lung of a subject. In certain embodiments, the antibody inhibits fibrosis in the lung of a subject with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). In some embodiments, the isolated monoclonal antibody disclosed herein induces an increase in fibrin degradation in a subject. In certain embodiments, the antibody increases fibrin degradation in the plasma of the subject. In some other embodiments, the isolated monoclonal antibody disclosed herein inhibits collagen accumulation in the lung of a subject. In some embodiments, the subject has IPF. In some other embodiments, the isolated monoclonal antibody disclosed herein increases D-dimer levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of a subject. In some embodiments, the subject has IPF. In some other embodiments, the isolated monoclonal antibody disclosed herein binds specifically to PAI-1, wherein the antibody inhibits the increase in lung weight due to fibrosis in a subject. In one embodiment, the subject has IPF.

In another aspect, disclosed herein is the use of a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody for the manufacture of a medicament for treating a condition caused by increased expression of PAI-1 or increased sensitivity to PAI-1 comprising administering to a patient orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically, wherein the condition is idiopathic pulmonary fibrosis.

In another aspect, disclosed herein is a method restoring plasmin generation comprising administering to a to a patient or other subject thereof orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody, wherein the plasmin generation facilitates therapeutic treatment of idiopathic pulmonary fibrosis.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, wherein the antibody restores fibrinolytic activity in a subject. In certain embodiments, the antibody restores fibrinolytic activity in a subject with acute ischemic stroke. The acute ischemic stroke can be either with or without thrombolysis. In some embodiments, the isolated monoclonal antibody restores clot lysis. In certain embodiments, the antibody restores in vitro clot lysis. In still other embodiments, the antibody restores in vitro clot lysis with an IC_{50} of about 2 nM.

In other aspects, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, wherein the antibody restores fibrin breakdown in a subject. In some embodiments, the subject has acute ischemic stroke.

In another aspect, disclosed herein is the use of a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody for the manufacture of a medicament for treating a condition caused by increased expression of PAI-1 or increased sensitivity to PAI-1 comprising administering to a patient orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically, wherein the condition is acute ischemic stroke with and without thrombolysis.

In another aspect, disclosed herein is a method restoring plasmin generation comprising administering to a patient or other subject in need thereof orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody, wherein the plasmin generation facilitates therapeutic treatment of acute ischemic stroke with and without thrombolysis.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, wherein the antibody inhibits formation of adhesions in a subject. In some embodiments, the adhesion formation is following surgery or injury to the subject. In some emboidments, the adhesion formation in the subject is abdominal. In other embodiments, the adhesion formation occurs in the shoulder, pelvis, heart, spine, hand, and other body regions of the subject.

In another aspect, disclosed herein is the use of a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody for the manufacture of a medicament for treating or preventing a condition caused by

increased expression of PAI-1 or increased sensitivity to PAI-1 comprising administering to a patient orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically, wherein the condition is abdominal adhesion formation.

In another aspect, disclosed herein is a method of restoring plasmin generation comprising administering to a to a patient or other subject in need thereof orally, parenterally by a solution for injection, by inhalation, or topically a pharmaceutically effective amount of a PAI-1 antibody, wherein the plasmin generation facilitates therapeutic treatment or prevention of adhesion formation. In some emboidments, the adhesion formation in the subject is abdominal.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds to a PAI-1/vitronectin complex. In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that neutralizes PAI-1 activity by inducing PAI-1 substrate conformation. In an embodiment, the antibody restores or is capable of restoring plasmin generation. In another embodiment, the isolated monoclonal antibody induces or is capable of inducing fibronectin degradation. In yet another embodiment, the isolated monoclonal antibody induces or is capable of inducing matrix metalloproteinases (MMP) activation.

In another aspect, the isolated monoclonal antibody disclosed herein is an antibody fragment. In some embodiments, the antibody is a single-chain Fv antibody. In other embodiments, the heavy chain and light chain are connected by a flexible linker to form a single-chain antibody. In other embodiments, the antibody is a Fab, Fab', or $(Fab')_2$ antibody.

In another aspect, disclosed herein is an isolated monoclonal antibody that binds specifically to PAI-1, wherein the antibody is a crystallized antibody. In an embodiment, disclosed herein is an isolated crystal comprising the Fab' fragment of monoclonal antibody A44, wherein the Fab' fragment consists of light chain sequence SEQ ID NO:7 and heavy chain sequence SEQ ID NO:6. In another embodiment, disclosed herein is an isolated crystal comprising a Fab' fragment comprising light chain sequence SEQ ID NO:93 and heavy chain sequence SEQ ID NO:86. In an embodiment, the isolated crystal comprises assimetric unit cell dimensions a=105 Å, b=152 Å and c=298 Å. In an embodiment, the isolated crystal belongs to P212121 space group. In another embodiment, the isolated crystal comprises a 3.3 Å resolution of x-ray diffraction. In an embodiment, the isolated crystal retains the biological activity of the crystallized antibody. In some embodiments, the isolated crystal has a greater half life in vivo than the soluble counterpart of the crystallized antibody.

In one aspect, disclosed herein is a pharmaceutical composition comprising: (a) the crystallized antibody that binds specifically to PAI-1 and (b) at least one pharmaceutical excipient which embeds or encapsulates the crystal.

In another aspect, disclosed herein is a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a therapeutically effective amount of any of the antibodies disclosed herein.

In one aspect, disclosed herein is a method of generating an antibody against PAI-1 comprising immunizing a mammal with a complex composed of PAI-1, or a fragment thereof, and vitronectin.

In another aspect, disclosed herein is a method of screening a PAI-1 antibody in an ELISA for its ability to block PAI-1's function as a tPA activity inhibitor, comprising the steps of: (a) binding PAI-1 to an ELISA plate; (b) incubating the ELISA plate with the PAI-1 antibody; (c) incubating the ELISA plate with tPA; (d) incubating the ELISA plate with labeled anti-tPA antibody; and (e) measuring the OD_{405} emitted by the labeled anti-tPA antibody; wherein a positive readout indicates that the PAI-1 antibody binds to PAI-1 but does not block formation of the covalent bond between PAI-1 and tPA, and a negative readout indicates that the PAI-1antibody blocks tPA interaction with PAI-1.

In another aspect, disclosed herein is a method of screening hybridomas. In certain embodiments, the method of screening comprises a reverse screening method using anti-mouse immobilized anti-PAI-1 antibodies. In other embodiments, the method of screening comprises or a forward screening assay using free PAI-1 as a ligand or against immobilized vitronectin. In certain embodiments, the method is applied to determine the affinity of an antibody for a PAI-1/vitronectin complex. In some embodiments, the method comprises: immobilizing vitronectin to a surface; contacting PAI-1 with the vitronectin immobilized to the surface, thereby forming a complex; contacting the surface comprising the complex with the antibody; separating the antibody bound to the complex from unbound antibody; detecting the antibody bound to the complex, and analyzing the levels of antibody bound to the complex to determine the affinity of the antibody for the complex.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts a schematic representation of the mechanisms between PAI-1 and the serine proteases tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). PAI-1 exhibits structural flexibility and can occur in a latent conformation or an active conformation when it is bound to vitronectin (Vn). The RCL region of PAI-1 bears the bait peptide bond (also called P1-P1') that is the cleavage site by the serine protease. A Michaelis complex with tPA or uPA forms first, then the catalytic triad reacts with the bait peptide bond to form an acyl-enzyme complex that, after cleavage of the P1-P'1 peptide bond, induces strong conformation changes. Acyl enzyme is a labile complex formed by covalent bond between the serine residue (black triangle) from catalytic triad from serine protease (tPA) and amino-acid from the substrate (black circle) that undergoes

further hydrolysis. The conformational changes causes insertion of the cleaved RCL into a β-strand with the protease staying covalently bound as an acyl enzyme with PAI-1. Under non physiological circumstance, hydrolysis of this acyl-enzyme complex may induce release of the cleaved PAI-1 and free active protease.

Figure 2 depicts a typical standard curve for antibody titration in the binding ELISA as described in Example 2. The antibodies 31C9, 33B8 and 33H1 were positive controls and IgG1 was as a negative control.

Figure 3 depicts a representation curve for a functional ELISA to select antibodies that block the interaction of PAI-1 with tPA as described in Example 4. The antibody 33H1 is a positive control, IgG1 is a negative control and A44 was identified as a positive antibody clone.

Figure 4 depicts neutralization of human PAI-1 blocking activity of tPA by A44 and commercially available antibodies (33B8 and 33H1) in the chromogenic assay described in Example 4.

Figure 5 depicts neutralization of human PAI-1 blocking activity of tPA by a selection of antibodies produced from different fusions (*see* Example 4).

Figure 6 depicts human PAI-1 and its orthologs block human tPA activity in chromogenic assay with the similar potency.

Figure 7 depicts neutralization of cynomolgus (cyno) and mouse PAI-1 blocking activity of human tPA by A44 and 33B8 (commercially available) antibodies in the chromogenic assay described in Example 4.

Figure 8 depicts SDS-Page analysis of the mechanism of action for antibodies 33H8 (converts PAI-1 from active to latent confirmation), 33H1 (converts PAI-1 from active to substrate conformation) and A44 to block the interaction of PAI-1 with tPA. Lane 1: molecular weight standards; Lane 2: PAI-1 only; Lane 3: tPA only; Lane 4: PAI-1 in the presence of tPA; Lane 5: 33B8 +PAI-1 +tPA; Lane 6: 33H1+PAI-1+tPA; Lane 7: A44+PAI-1+tPA; Lane 8: mAb is an isotype control antibody.

Figure 9 depicts SDS-Page analysis of the mechanism of action for antibodies 33H8 (converts PAI-1 from active to latent confirmation), 33H1 (converts PAI-1 from active to substrate conformation) and antibodies developed from fusions C26, E16 and E21 to block the interaction of PAI-1 with tPA. Lane 1: molecular weight standards; Lane 2: PAI-1 only; Lane 3: tPA only; Lane 4: PAI-1 in the presence of tPA; Lane 5: 33B8 +PAI-1 +tPA; Lane 6: 33H1+PAI-1+tPA; Lane 7: C26+PAI-1+tPA; Lane 8: E16+PAI-1+tPA; Lane 9: E21+PAI-1+tPA; Lane 10: mAb is an isotype control antibody.

Figure 10 depicts SDS-Page analysis of the mechanism of action for antibodies 33H8 (converts PAI-1 from active to latent confirmation), 33H1 (converts PAI-1 from active to substrate

conformation) and antibodies developed from fusions A39, B109 and C45 to block the interaction of PAI-1 with tPA. Lane 1: molecular weight standards; Lane 2: PAI-1 only; Lane 3: tPA only; Lane 4: PAI-1 in the presence of tPA; Lane 5: 33B8 +PAI-1 +tPA; Lane 6: 33H1+PAI-1+tPA; Lane 7: A39+PAI-1+tPA; Lane 8: B109+PAI-1+tPA; Lane 9: C45+PAI-1+tPA; Lane 10: mAb is an isotype control antibody.

Figure 11 depicts the alignment of the light chain of the following murine antibodies: A105 (SEQ ID NO: 3), A39 (SEQ ID NO: 5), A44 (SEQ ID NO: 7), A71 (SEQ ID NO: 9), A75 (SEQ ID NO: 81), B109 (SEQ ID NO: 11),B28 (SEQ ID NO: 13), C45 (SEQ ID NO: 15), E16 (SEQ ID NO: 17), and E21 (SEQ ID NO: 19). CDRs are highlighted in bold.

Figure 12 depicts the alignment of the heavy chain of the following murine antibodies: A105 (SEQ ID NO: 2), A39 (SEQ ID NO: 4), A44 (SEQ ID NO: 6), A71 (SEQ ID NO: 8), A75 (SEQ ID NO: 80), B109 (SEQ ID NO: 10), B28 (SEQ ID NO: 12), C45 (SEQ ID NO: 14), E16 (SEQ ID NO: 16), and E21 (SEQ ID NO: 18). CDRs, as defined by IMGT, are highlighted in bold.

Figure 13 depicts the alignment of murine A44 light chain (SEQ ID NO: 7) with vk1 (SEQ ID NO: 101) and vlambda3 (SEQ ID NO: 102).

Figure 14 depicts the alignment of murine A44 heavy chain (SEQ ID NO: 6) with vh2 (SEQ ID NO: 103) and vh4 (SEQ ID NO: 104).

Figure 15 depicts clone A44 humanization VL with all constructs aligned. All aligned sequences (SEQ ID NOs: 91-98) are further described below in Table 25. Black boxes represent CDR domains. Highlighted residues vary in sequence from the residue directly above in the alignment. Residue numbering is as described by IMGT.

Figure 16 depicts clone A44 humanization VH with all constructs aligned. All aligned sequences (SEQ ID NOs: 82-90) are further described below in Table 25. Black boxes represent CDR domains. Highlighted residues vary in sequence from the residue directly above in the alignment. Residue numbering is as described by IMGT.

Figure 17 depicts percent inhibition of PAI-1 activity was plotted as a function of mAb concentration and IC50 was determined Imax using Biostat speed software.

Figure 18 depicts purification of homogeneity recombinant 6-His tagged Fab A44.

Figure 19 depicts SPR analysis with Biacore 2000 using single kinetic analysis of human PAI-1 glycosylated binding to immobilized APG antibody. A sensogram from single-cycle kinetic is shown in grey. Fit model is shown in black.

Figure 20 depicts human plasma PAI-1 neutralization by APG, APGv2, and APGv4 antibodies as determined by UK-PAI-1 complex formation detection by ELISA. Percent inhibition of PAI-1 activity was plotted as a function of concentration of APG, APGv2, or APGv4 antibodies.

Figure 21 depicts restoration of human plasma clot lysis by A44V11 (1, 3 or 10 nM) in the presence of tPA 1 nM and PAI-1 3 nM as detected by turbidimetry kinetic measurement by absorbance reading at 340 nm as a function of time (min).

Figure 22 depicts absence of restoration of human plasma clot lysis by human IgG1 negative controle (1, 3 or 10 nM) in the presence of tPA 1 nM and PAI-1 3 nM as detected by absorbance at 340 nm as a function of time (min).

Figure 23 depicts restoration of human plasma clot lysis by A44V11 or human IgG1 isotype negative control at various concentrations.

Figure 24 depicts restoration of human plasma clot lysis by APG, APGV2 or APGV4 at 3 nM in the presence of tPA 1 nM and PAI-1 3 nM as detected by absorbance at 340 nm as a function of time (min).

Figure 25 depicts restoration of human plasma clot lysis by APG variant 2 and 4 at various concentrations.

Figure 26 depicts immunoblot anti-PAI-1 on human LL29 myofibroblast supernatants at 48H after treatment by A44V11 or IgG isotype control mAb at 50 nM and TGFβ 5 ng/ml.

Figure 27 depicts generic MMP activity in human primary lung fibroblasts after cell treatment for 48hr with PBS (control), plasminogen (Pg), A44v11 and plasminogen (A+Pg) or negative human IgG and plasminogen (Neg+Pg).

Figure 28 depicts human active PAI-1 level in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) (A) and in lung lysate (B) from bleomycin treated mice at day 7 and day 9 following treatment at day 4 with A44 or IgG1 at 10 mg/kg or PBS by i.p. administration. Active PAI-1 determined by ELISA (# HPAIKT Molecular Innovation). Percentage of inhibition were calculated by dividing the difference between A44 bleo and IgG bleo by the difference between IgG bleo and untreated (PBS) mice group.

Figure 29 depicts mouse D-Dimer level in BALF from bleomycin treated mice at day7 and day9 following treatment at day4 with A44 or IgG1 at 10 mg/kg or PBS by i.p. administration as determined by ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago). Fold increase in D-dimer induced by A44 in comparison to IgG are indicated.

Figure 30 depicts right lung weight from transgenic humanized mice 21 days after either saline or bleomycin treatment followed by PBS (vehicle), IgG1 or A44 10mg/kg i.p. administration from day4 to day20 every 3 days.

Figure 31 depicts hydroxyproline lung content in transgenic humanized mice 21 days after either saline or bleomycin treatment followed by PBS (vehicle), IgG1 or A44 10mg/kg i.p. administration from day4 to day20 every 3 days.

Figure 32 depicts active PAI-1 level in plasma from monkeys treated by A44V11 (A) mAb (n=5) or with IgG1 isotype control (B) (n=4) (5 mg/kg ip) 24 hours before LPS challenge (100 ug/kg

iv). Blood samples were harvested at the indicated time point and active PAI-1 levels were determined in plasma using the ELISA (# HPAIKT from Molecular Innovation).

Figure 33 depicts active PAI-1 level in liver biopsy from monkeys treated by A44V11 (A) mAb (n=5) or with IgG1 isotype control (B) (n=4) (5 mg/kg ip) 24 hours before LPS challenge (100 ug/kg iv). Liver biopsies were harvested in anesthetized monkeys at the indicated time point and active PAI-1 levels were determined in lysates using the ELISA (# HPAIKT from Molecular Innovation).

Figure 34 depicts D-dimer level in plasma from monkeys treated by A44V11 (A) mAb (n=5) or with IgG1 isotype control (B) (n=4) (5 mg/kg ip) 24 hours before LPS challenge (100 ug/kg iv). Blood samples were harvested at the indicated time point and D-dimer levels were determined in plasma using the ELISA.

Figure 35 depicts Plasmin-α2 Antiplasmin (PAP) complexes level in plasma from monkeys treated by A44V11 (A) mAb (n=5) or with IgG1 isotype control (B) (n=4) (5 mg/kg ip) 24 hours before LPS challenge (100 ug/kg iv). Blood samples were harvested at the indicated time point and PAP levels were determined in plasma using the ELISA (# Asserachrom PAP from Diagnostica Stago).

Figure 36 depicts level of active PAI-1 in intraperitoneal fluid (IPF) and uterine horn lysates. Active PAI-1 levels in the intraperitoneal fluid (A) and uterine horn lysates (B). At the 6 hour and Day 7 time points active PAI-1 levels were lower in both intraperitoneal fluid (IPF) and Uterine Horn (UH) Lysates in the animals treated with A44V11 antibody in comparison to the isotype control antibody treated animlas, no difference was observed at 72 hour time point. (* $p<0.001$ calculated by the Student T-test)

Figure 37 depicts another example of purification of homogeneity recombinant 6-His tagged Fab A44.

Figure 38 depicts purification of homogeneity recombinant 6-His tagged Fab A44 complexed with the human wt PAI-1 protein.

Figure 39(a) depicts the complex crystallization of the Fab A44/PAI-1 complex, and Figure 39 (b) depicts the best optimized crystals.

Figure 40 depicts the rod-like single crystals of the Fab A44/PAI-1 complex.

Figure 41 depicts Fab A44 recognition the active form of human PAI-1 and the latent form of cyno PAI-1.

Figure 42 depicts the PAI-1 epitope recognized by Fab A44 in (A) active human PAI-1, and (B) latent cyno PAI-1.

Figure 43 depicts the heavy chain paratope of the Fab A44/PAI-1 complex.

Figure 44 depicts the light chain paratope of the Fab A44/PAI-1 complex.

Figure 45 depicts a sequence alignment of the proposed A44 binding epitopes of cyno, human, rat, and mouse PAI-1. Sequences are excerpted from SEQ ID NO:1 (PAI-1 human), SEQ ID NO:162 (PAI-1 cyno), SEQ ID NO:163 (PAI-1 mouse), and SEQ ID NO:164 (PAI-1 rat).

Figure 46 depicts the comparison of the mouse PAI-1 structure with the structure of the human PAI-1/A44V11 complex.

Figure 47 shows the structure of human PAI-1/A44V11 complex and the model of vibronectin binding to PAI-1.

Figure 48 depicts peptic peptide coverage of cyno-PAI-1 (SEQ ID NO:162); 95.3% sequence coverage is obtained from 150 overlapping peptic peptides.

Figure 49 depicts representative deuterium uptake plots for cyno-PAI-1 peptides in the unbound (circle lines), APGv2-bound (x-lines) and A44v11-bound (diamond lines) states. Residue ranges/positions are from SEQ ID NO:162. (A) most of the peptic peptides showed no difference between cyno-PAI-1 alone or bound to either mAb. (B), peptides covering residues 44-64 showed similar protection from exchange in both mAb-bound states. (C), peptides incorporating residues 295-322 incorporate less deuterium in both mAb-bound states, however the magnitude of protection is greater for A44v11.

Figure 50 depicts hydrogen/deuterium exchange (HDX) comparison of cyno-PAI-1 alone and bound to A44v11. (A), butterfly plot of the average relative fractional exchange with the unbound state above and the bound state below. The lines correspond to data acquired for the 10 sec, 1 min, 5 min, and 240 min time points. In (B), plot of the difference data (in daltons) from the above plot in (A) for cyno-PAI-1 alone or bound to A44v11.

Figure 51 depicts HDX comparison of cyno-PAI-1 alone and bound to APGv2. In (A), butterfly plot of the average relative fractional exchange with the unbound state above and the bound state below. The lines correspond to data acquired for the 10 sec, 1 min, 5 min and 240 min time points. In (B), plot of the difference data from panel (A) above for cyno-PAI-1 alone or bound to APGv2.

Figure 52 depicts HDX comparison of cyno-PAI-1 bound to A44v11 and bound to APGv2. In (A), butterfly plot of the average relative fractional exchange with the APGv2 bound state above and the A44v11 bound state below. The lines correspond to data acquired for the 10 sec, 1 min, 5 min and 240 min time points. In (B), plot of the difference data from panel (A) above for cyno-PAI-1 bound to APGv2 or A44v11.

Figure 53 depicts the cyno-PAI-1:A44v11 epitope determined by HDX MS. The residues of cynoPAI-1 (SEQ ID NO: 162) which show protection from exchange in the A44v11 antibody-bound state are shown in bold. The residues of cyno-PAI-1:A44v11 epitope determined from the crystallization studies is shown in boxes.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides antibodies and fragments thereof that specifically bind to human PAI-1 and modulate the biological functions of PAI-1. Such antibodies are particularly useful for treating PAI-1-associated disease or disorders (e.g., fibrosis). The invention also provides pharmaceutical compositions, as well as nucleic acids encoding PAI-1 antibodies, recombinant expression vectors and host cells for making such antibodies, or fragments thereof. Methods of using antibodies as disclosed herein to detect PAI-1 or to modulate PAI-1 activity, either *in vitro* or *in vivo*, are also encompassed by the invention.

I. Definitions

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined.

As used herein, the term "human PAI-1" refers to a peptide comprising or consisting of the amino acid sequence listed below:

VHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTG
GETQQQIQAAMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRD
LKLVQGFMPHFFRLFRSTVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISNLLGK
GAVDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQT
NKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEVPLSALTNILSAQLI
SHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSD
QEPLHVAQALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIMDRPFLFVVRH
NPTGTVLFMGQVMEP (SEQ ID NO. 1), or a fragment thereof.

As used herein, the term "antibody" refers to immunoglobulin molecules comprising four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds, as well as multimers thereof (e.g., IgM). Each heavy chain comprises a heavy chain variable region (abbreviated V_H or VH) and a heavy chain constant region (C_H or CH). The heavy chain constant region comprises three domains, C_H1, C_H2 and C_H3. Each light chain comprises a light chain variable region (abbreviated V_L or VL) and a light chain constant region (C_L or CL). The light chain constant region comprises one domain (C_L1). The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDRs), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs

and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

As used herein, the term "antigen-binding fragment" of an antibody includes any naturally occurring, enzymatically obtainable, synthetic, or genetically engineered polypeptide or glycoprotein that specifically binds an antigen to form a complex. Antigen-binding fragments of an antibody may be derived, e.g., from full antibody molecules using any suitable standard techniques such as proteolytic digestion or recombinant genetic engineering techniques involving the manipulation and expression of DNA encoding antibody variable and optionally constant domains. Non-limiting examples of antigen-binding portions include: (i) Fab fragments; (ii) $F(ab')_2$ fragments; (iii) Fd fragments; (iv) Fv fragments; (v) single-chain Fv (scFv) molecules; (vi) dAb fragments; and (vii) minimal recognition units consisting of the amino acid residues that mimic the hypervariable region of an antibody (e.g., an isolated complementarity determining region (CDR)). Other engineered molecules, such as diabodies, triabodies, tetrabodies and minibodies, are also encompassed within the expression "antigen-binding fragment."

As used herein, the term "CDR" or "complementarity determining region" means the noncontiguous antigen combining sites found within the variable region of both heavy and light chain polypeptides. These particular regions have been described by Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) and Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991), and by Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) and by MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996) where the definitions include overlapping or subsets of amino acid residues when compared against each other. The Kabat definition is based on sequence variability. The IMGT unique numbering for all IG and TR V-regions of all species relies on the high conservation of the structure of the variable region (Lefranc, Mp *et al.*, *Dev comp. Immunol.* 27:55-77, 2003). IMGT numbering, set up after aligning more than 5,000 sequences takes into account and combines the definition of the framework and CDRs. The Clothia definition is based on the location of the structural loop regions. The Contact definition (MacCallum *et al.*) is based on an analysis of the complex crystal structures and antibody-antigen interactions. The amino acid residues which encompass the CDRs as defined by each of the above cited references are set forth for comparison. In one embodiment disclosed herein , the term "CDR" is a CDR as defined by the Kabat definition. In another embodiment disclosed herein , the CDR is a CDR as defined by IMGT.

As used herein the term "framework (FR) amino acid residues" refers to those amino acids in the framework region of an Ig chain. The term "framework region" or "FR region" as used herein, includes the amino acid residues that are part of the variable region, but are not part of the CDRs (e.g., using the Contact definition of CDRs). Therefore, a variable region framework is between about 100-120 amino acids in length but includes only those amino acids outside of the CDRs.

The present invention also encompasses "conservative amino acid substitutions" in the CDR amino acid sequences of the antibodies disclosed herein, i.e., amino acid sequence modifications which do not abrogate the binding of the antibody to the antigen, i.e., PAI-1. A conservative substitution is a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. For example, a conservative substitution results from the replacement of a non-polar residue in a polypeptide with any other non-polar residue. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis" (Cunningham *et al.*, *Science* 244:1081-85 (1989)). Conservative amino acid substitutions include the substitution of an amino acid in one class by an amino acid of the same class, where a class is defined by common physicochemical amino acid side chain properties and high substitution frequencies in homologous proteins found in nature, as determined, for example, by a standard Dayhoff frequency exchange matrix or BLOSUM matrix. Six general classes of amino acid side chains have been categorized and include: Class I (Cys); Class II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Class III (Asn, Asp, Gln, Glu); Class IV (His, Arg, Lys); Class V (Ile, Leu, Val, Met); and Class VI (Phe, Tyr, Trp). For example, substitution of an Asp for another class III residue such as Asn, Gln, or Glu, is a conservative substitution. Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a PAI-1 antibody is replaced with another amino acid residue from the same class. Methods of identifying amino acid conservative substitutions which do not eliminate antigen binding are well-known in the art (*see, e.g.*, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180, 1993; Kobayashi *et al. Protein Eng.* 12:879, 1999; and Burks *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412, 1997). General rules for conservative amino acid substitutions are set forth in Table 1 below.

Table 1: Conservative Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Select Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala

His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues that are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and other reversed or inverted forms of amino acid moieties.

Conservative modifications to the amino acid sequence (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) are expected to produce PAI-1 antibodies having functional and chemical characteristics similar to those of naturally occurring PAI-1 antibodies. In contrast, substantial modifications in the functional or chemical characteristics of PAI-1 antibodies may be accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues may be divided into groups based on common side chain properties:

1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;

3) acidic: Asp, Glu;

4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and

6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

Non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human PAI-1 antibody that are homologous with non-human PAI-1 antibody, or into the non-homologous regions of the molecule.

In certain aspects, the heavy or light chain variable regions may be 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% identical to any of the variable region sequences disclosed herein.

As used herein, the term "specifically binds to" refers to the ability of an antibody or an antigen-binding fragment thereof to bind to an antigen with an Kd that is lower than 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, or less. The term also encompasses refers to the ability of an antibody or an antigen-binding fragment thereof to bind to an antigen with an affinity that is at least two-fold greater than its affinity for a nonspecific antigen.

The disclosure also provides antibodies that competitively inhibit binding of an antibody to an epitope disclosed herein as determined by any method known in the art for determining competitive binding, for example, the immunoassays described herein. In certain embodiments, the antibody competitively inhibits binding to the epitope by at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 60%, or at least 50%.

As used herein, the term "antigen" refers to the binding site or epitope recognized by an antibody or antigen binding fragment thereof.

As used herein, the term "vector" is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid," which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. The terms, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

Numerous expression vector systems may be employed for the purposes of this invention. For example, one class of vector utilizes DNA elements which are derived from animal viruses such as bovine papilloma virus, polyoma virus, adenovirus, vaccinia virus, baculovirus, retroviruses (RSV, MMTV or MOMLV) or SV40 virus. Others involve the use of polycistronic systems with internal ribosome binding sites. Additionally, cells which have integrated the DNA into their chromosomes may be selected by introducing one or more markers which allow selection of transfected host cells. The marker may provide for prototrophy to an auxotrophic host, biocide resistance (e.g., antibiotics) or resistance to heavy metals such as copper. The selectable marker gene can either be directly linked to the DNA sequences to be expressed, or introduced into the same cell by cotransformation. Additional elements may also be needed for optimal synthesis of mRNA. These elements may include signal sequences, splice signals, as well as transcriptional promoters, enhancers, and termination signals. In particular embodiments the cloned variable region genes are inserted into an expression vector along with the heavy and light chain constant region genes (e.g. human) synthetic as discussed above.

More generally, once a vector or DNA sequence encoding an antibody, or fragment thereof, has been prepared, the expression vector may be introduced into an appropriate host cell. That is, the host cells may be transformed. Introduction of the plasmid into the host cell can be accomplished by various techniques well known to those of skill in the art. These include, but are not limited to, transfection (including electrophoresis and electroporation), protoplast fusion, calcium phosphate precipitation, cell fusion with enveloped DNA, microinjection, and infection with intact virus. See, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). An embodiment disclosed herein is plasmid introduction into the host via electroporation. The transformed cells are grown under conditions appropriate to the production of the light chains and heavy chains, and assayed for heavy or light chain protein synthesis. Exemplary assay techniques include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), or fluorescence-activated cell sorter analysis (FACS), immunohistochemistry and the like.

As used herein, the term "transformation" shall be used in a broad sense to refer to the introduction of DNA into a recipient host cell that changes the genotype and consequently results in a change in the recipient cell.

"Host cells" refers to cells that have been transformed with vectors constructed using recombinant DNA techniques and encoding at least one heterologous gene. In descriptions of processes for isolation of polypeptides from recombinant hosts, the terms "cell" and "cell culture" are used interchangeably to denote the source of antibody unless it is clearly specified otherwise. In other

words, recovery of polypeptide from the "cells" may mean either from spun down whole cells, or from the cell culture containing both the medium and the suspended cells.

It should be understood that this term is intended to refer not only to the particular subject cell but to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein.

As used herein, the term "treat," "treating," and "treatment" refer to therapeutic or preventative measures described herein. The methods of "treatment" employ administration to a subject, an antibody or antigen binding fragment disclosed herein , for example, a subject having a PAI-1-associated disease or disorder (*e.g.*, a fibrotic disease) or predisposed to having such a disease or disorder, in order to prevent, cure, delay, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of the disease or disorder or recurring disease or disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment.

As used herein, the term "PAI-1-associated disease or disorder" includes disease states with or without symptoms associated with a disease state, where altered levels or activity of PAI-1 are found. Exemplary PAI-1-associated diseases or disorders include various types of fibrosis.

As used herein, the term "effective amount" refers to that amount of an antibody or an antigen binding fragment thereof that binds PAI-1, which is sufficient to effect treatment, prognosis or diagnosis of a PAI-1-associated disease or disorder, as described herein, when administered to a subject. A therapeutically effective amount will vary depending upon the subject and disease condition being treated, the weight and age of the subject, the severity of the disease condition, the manner of administration and the like, which can readily be determined by one of ordinary skill in the art. The dosages for administration can range from, for example, about 1 ng to about 10,000 mg, about 1 ug to about 5,000 mg, about 1 mg to about 1,000 mg, about 10 mg to about 100 mg, of an antibody or antigen binding fragment thereof, disclosed herein . Dosage regiments may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. An effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects (*i.e.*, side effects) of an antibody or antigen binding fragment thereof are minimized or outweighed by the beneficial effects.

As used herein, the term "subject" or "mammal" includes any human or non-human animal.

As used herein, the term "epitope" refers to an antigenic determinant that interacts with a specific antigen binding site in the variable region of an antibody molecule known as a paratope. A single antigen may have more than one epitope. Thus, different antibodies may bind to different areas on an antigen and may have different biological effects. Epitopes may be either conformational or linear. A conformational epitope is produced by spatially juxtaposed amino acids from different

segments of the linear polypeptide chain. A linear epitope is one produced by adjacent amino acid residues in a polypeptide chain.

It is noted here that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise.

II. Anti-PAI-1Antibodies

In one aspect the invention provides antibodies, or antigen binding fragments thereof, that specifically bind to human PAI-1. Exemplary VH, VL and CDR amino acid sequences and nucleotide sequences of the antibodies disclosed herein are set forth in Table 2. CDR regions shown in Table 2 are defined by IMGT.

Table 2: VH, VL and CDR amino acid sequences of exemplary anti-PAI-1 antibodies or fragments thereof

ANTIBODY	SEQUENCE	SEQ ID NO
mA105 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSIYWIEWVKQRPG LGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAFMQLSS LTSEDSAVYYCARGGLYYDLDYWGQGTILTVSSAKTTPP	2
mA105 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ RPGQSPQRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLSRVEGA DLGVYYCWQDRHFPRTFGGGTKLEIKRAD	3
mA39 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQWVKQRP GHGLEWIGEILPGSNTNYNEKFKDKATFTADSSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARLGIGLRGALDYWGQGTSVTVSSAKTTPP	4
mA39 VL	DIQMTHSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYHQKQGKS PQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNIKSLQPEDFGTFY CQHRYGSPWTFGGGTKLEIKRAD	5
mA44 VH	EMQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSMTNGYWNWIRKFPG NKLEYMGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRNTSKNQYYLQLSSV TTEDTATYYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP	6
mA44 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWLQQKPGKS PKTLIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYY CLQYDEFPPTFGGGTKLEIKRAD	7
mA71 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQRPG HGLDWIGEILPGSGNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTVYMQLS SLTSEDSAVYYCARGGLYYNLDSWGQGTTLTVSSAKTTPP	8
mA71 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLYWLLQ RPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCWQDTHFPRTFGGGTKLEIKRAD	9
mA75 VH	QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIAWLKQRPG HGLEWIAEILPGSGLTNYNEIFRGKATFTADTSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARGGLYYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAP	80
mA75 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASICKSSQSLLDSEGKTYLNWLFQR PGQSPKRLIYLVCKLDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEGED LGVYYCWQGSHFPQTFGGGTKLEIKRAD	81

mB109 VH	EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRP GQGLEWMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDTTYNQKFEDK AKLTAVASASTAYMEVSSLTNEDSAVYYCTRGLRRWGAMD YWGQGTSVTVSSAKTTPP	10
mB109 VL	DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSIPCKASQDVSSAVAWYQQKLG QSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAV YYCQQHYSSPYTFGGGTNLEIKRAD	11
mB28 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQRPGG LEWIGKILPGSGGANYNEKFKGKATVTADTSSNTVYMQLSSL TSEDSAVYYCARLSTGTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP	12
mB28 VL	DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVYSYLAWYQQKQGK SPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLQPEDFGS YYCQHHYGTPPTFGGGTKVEIKRAD	13
mC45 VH	QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPG QGLEWIGVIHPGSGVTNYNEKFKGKAILTADKSSSTAYMQLSS LTSDDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGTSVTVSS	14
mC45 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKS PKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYY CLQYDEFPRTFGGGTKLEIK	15
mE16 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQTPE KGLGWVASLRTGGNTYYSDSVKGRFTISRDNDRNILYLQMSS LTSEDTAVYYCARGLRHWGYFDVWGAGTTVTVSS	16
mE16 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVSTAVGWYQQEPG QSPKLLIYSASNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAV YYCQQHYSSPWTFGGGTKLEIK	17
mE21 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRP EQGLEWIGWIDPENGDTEYDPKFQAKATMTADTSSNTAYLQL SSLTSEDTAVYYCMYGNYPYYFDYWGQGTTLTVSS	18
mE21 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPWTFGGGTKLEIK	19
mA105 HCDR3	ARGGLYYDLDY	20
mA105 HCDR2	ILPGSGST	21
mA105 HCDR1	GFTFSIYW	22
mA105 LCD3	WQDRHFPRT	23
mA105 mA71 LCDR2	LVS	24
mA105 mA71 LCDR1	QSLLDSDGKTY	25
mA39 HCDR3	ARLGIGLRGALDY	26
mA39 HCDR2	ILPGSNT	27

mA39 HCDR1	GYTFNIYW	28
mA39 LCDR3	QHRYGSPWT	29
mA39 LCDR2	NAK	30
mA39 LCDR1	ENIYSY	31
mA44 HCDR3	ARWHYGSPYYFDY	32
mA44 HCDR2	ITYSGST	33
mA44 HCDR1	GDSMTNGY	34
mA44 LCDR3	LQYDEFPPT	35
mA44 LCDR2	RAN	36
mA44 LCDR1	QDINSY	37
mA71 HCDR3	ARGGLYYNLDS	38
mA71 HCDR2	ILPGSGNT	39
mA71 HCDR1	GFTFSTYW	40
mA71 LCDR3	WQDTHFPRT	41
mA71 LCDR2	LVS	42
mA71 LCDR1	QSLLDSDGKTY	43
mA75 HCDR3	ARGGLYYAMDY	44
mA75 HCDR2	ILPGSGLT	45
mA75 HCDR1	GFTFSTYW	46
mA75 LCDR3	WQGSHFPQT	47
mA75 LCDR2	LVC	48
mA75 LCDR1	QSLLDSEGKTY	49

mB109 HCDR3	TRGLRRWGAMDY	50
mB109 HCDR2	ILPGSGLT	51
mB109 HCDR1	GFTFSTYW	52
mB109 LCDR3	QQHYSSPYT	53
mB109 LCDR2	SAS	54
mB109 LCDR1	QDVSSA	55
mB28 HCDR3	ARLSTGTRGAFDY	56
mB28 HCDR2	ILPGSGGA	57
mB28 HCDR1	GYTFSISW	58
mB28 LCDR3	QHHYGTPPT	59
mB28 LCDR2	NAK	60
mB28 LCDR1	ENVYSY	61
mC45 HCDR3	ARDYYGSSHGLMDY	62
mC45 HCDR2	IHPGSGVT	63
mC45 HCDR1	GYAFTNYL	64
mC45 LCDR3	LQYDEFPRT	65
mC45 LCDR2	RAN	66
mC45 LCDR1	QDINSY	67
mE16 HCDR3	ARGLRHWGYFDV	68
mE16 HCDR2	LRTGGNT	69
mE16 HCDR1	GFTFSNYG	70
mE16 LCDR3	QQHYSSPWT	71
mE16 LCDR2	SAS	72
mE16 LCDR1	QDISNY	73
mE21 HCDR3	MYGNYPYYFDY	74
mE21 HCDR2	IDPENGDT	75

mE21 HCDR1	GFNIKDYY	76
mE21 LCDR3	QQGNTLPWT	77
mE21 LCDR2	YTS	78
mE21 LCDR1	QDISNY	79
m= murine; VH=variable heavy chain; VL=variable light chain;		

In another embodiment, the present invention provides anti-PAI-1 antibodies that bind to the same epitope or competitively inhibit an antibody, or antigen binding fragment thereof comprising the VH and VL region amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 6 and 7 respectively. Such antibodies can be identified using routine competition binding assays including, for example, surface plasmon resonance (SPR)-based competition assays.

III. Modified Anti-PAI-1 antibodies

In certain embodiments, anti-PAI-1 antibodies disclosed herein may comprise one or more modifications. Modified forms of anti-PAI-1 antibodies disclosed herein can be made using any techniques known in the art.

i) Reducing Immunogenicity

In certain embodiments, anti-PAI-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, disclosed herein are modified to reduce their immunogenicity using art-recognized techniques. For example, antibodies, or fragments thereof, can be chimerized, humanized, or deimmunized.

In one embodiment, an antibody, or antigen binding fragments thereof, disclosed herein may be chimeric. A chimeric antibody is an antibody in which different portions of the antibody are derived from different animal species, such as antibodies having a variable region derived from a murine monoclonal antibody and a human immunoglobulin constant region. Methods for producing chimeric antibodies, or fragments thereof, are known in the art. *See e.g.*, Morrison, *Science* 229:1202, 1985; Oi *et al., BioTechniques* 4:214, 1986; Gillies *et al., J. Immunol. Methods* 125:191, 1989; U.S. Patent Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 4,816,397, which are incorporated herein by reference in their entireties. Techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851, 1984; Neuberger *et al., Nature* 312:604, 1984; Takeda *et al., Nature* 314:452, 1985) may be employed for the synthesis of said molecules. For example, a genetic sequence encoding a binding specificity of a mouse anti-PAI-1 antibody molecule may be fused together with a sequence from a human antibody molecule of appropriate biological activity. As used herein, a chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species,

such as those having a variable region derived from a murine monoclonal antibody and a human immunoglobulin constant region, *e.g.*, humanized antibodies.

In another embodiment, an antibody, or antigen binding fragment thereof, as disclosed herein is humanized. Humanized antibodies have a binding specificity comprising one or more complementarity determining regions (CDRs) from a non-human antibody and framework regions from a human antibody molecule. Often, framework residues in the human framework regions will be substituted with the corresponding residue from the CDR donor antibody to alter, or improve, antigen binding. These framework substitutions are identified by methods well known in the art, *e.g.*, by modeling of the interactions of the CDR and framework residues to identify framework residues important for antigen binding and sequence comparison to identify unusual framework residues at particular positions. *See e.g.* Queen *et al.*, U.S. Patent No. 5,585,089; Riechmann *et al., Nature* 332:323, 1988, which are incorporated herein by reference in their entireties. Antibodies can be humanized using a variety of techniques known in the art including, for example, CDR-grafting (EP 239,400; International Publication No. WO 91/09967; U.S. Patent Nos. 5,225,539; 5,530,101; and 5,585,089), veneering or resurfacing (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28:489, 1991; Studnicka *et al., Protein Engineering* 7:805, 1994; Roguska. *et al., PNAS* 91:969, 1994), and chain shuffling (U.S. Patent No. 5,565,332).

In a particular embodiment, a humanization method is employed that is based on the impact of the molecular flexibility of the antibody during and at immune recognition (see International Publication No. WO2009/032661, which is incorporated herein by reference in its entirety). Protein flexibility is related to the molecular motion of the protein molecule. Protein flexibility is the ability of a whole protein, a part of a protein or a single amino acid residue to adopt an ensemble of conformations which differ significantly from each other. Information about protein flexibility can be obtained by performing protein X-ray crystallography experiments (*see, for example*, Kundu *et al., Biophys. J.* 83:723, 2002), nuclear magnetic resonance experiments (*see, for example*, Freedberg *et al., J. Am. Chem. Soc.* 120:7916, 1998) or by running molecular dynamics (MD) simulations. An MD simulation of a protein is done on a computer and allows one to determine the motion of all protein atoms over a period of time by calculating the physical interactions of the atoms with each other. The output of a MD simulation is the trajectory of the studied protein over the period of time of the simulation. The trajectory is an ensemble of protein conformations, also called snapshots, which are periodically sampled over the period of the simulation, *e.g.* every 1 picosecond (ps). It is by analyzing the ensemble of snapshots that one can quantify the flexibility of the protein amino acid residues. Thus, a flexible residue is one which adopts an ensemble of different conformations in the context of the polypeptide within which that residue resides. MD methods are known in the art, see, e.g., Brooks *et al.* "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley,

New York, 1988). Several software enable MD simulations, such as Amber (*see* Case *et al. J. Comp. Chem.* 26:1668, 2005; Brooks *et al. J. Comp. Chem.* 4:187, 1983; and MacKerell *et al.* (1998) in "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer *et al.*, eds. Chichester: John Wiley & Sons) or Impact (*see* Rizzo *et al. J. Am. Chem. Soc.*; 122:12898, 2000).

Most protein complexes share a relatively large and planar buried surface and it has been shown that flexibility of binding partners provides the origin for their plasticity, enabling them to conformationally adapt to each other (Sundberg and Mariuzza, *Structure* 8, R137-R142, 2000). As such, examples of "induced fit" have been shown to play a dominant role in protein-protein interfaces. In addition, there is a steadily increasing body of data showing that proteins actually bind ligands of diverse shapes, sizes and composition (*Protein Science* 11:184-187, 2002) and that the conformational diversity appears to be an essential component of the ability to recognize different partners (James *et al., Science* 299:1362, 2003). Flexible residues are involved in the binding of protein-protein partners (Grunberg *et al., Structure* 14, 683, 2006).

The flexible residues can adopt a variety of conformations that provide an ensemble of interaction areas that are likely to be recognized by memory B cells and to trigger an immunogenic response. Thus, an antibody can be humanized by modifying a number of residues from the framework so that the ensemble of conformations and of recognition areas displayed by the modified antibody resemble as much as possible those adopted by a human antibody. That can be achieved by modifying a limited number of residues by: (1) building a homology model of the parent mAb and running an MD simulation; (2) analyzing the flexible residues and identification of the most flexible residues of a non-human antibody molecule, as well as identifying residues or motifs likely to be a source of heterogeneity or of degradation reaction; (3) identifying a human antibody which displays the most similar ensemble of recognition areas as the parent antibody; (4) determining the flexible residues to be mutated, residues or motifs likely to be a source of heterogeneity and degradation are also mutated; and (5) checking for the presence of known T cell or B cell epitopes. The flexible residues can be found using an MD calculation as taught herein using an implicit solvent model, which accounts for the interaction of the water solvent with the protein atoms over the period of time of the simulation.

Once the set of flexible residues has been identified within the variable light and heavy chains, a set of human heavy and light chain variable region frameworks that closely resemble that of the antibody of interest is identified. That can be done, for example, using a BLAST search on the set of flexible residues against a database of antibody human germ line sequence. It can also be done by comparing the dynamics of the parent mAb with the dynamics of a library of germ line canonical structures. The CDR residues and neighboring residues are excluded from the search to ensure high affinity for the antigen is preserved. Flexible residues then are replaced.

When several human residues show similar homologies, the selection is driven also by the nature of the residues that are likely to affect the solution behavior of the humanized antibody. For instance, polar residues will often occur in exposed flexible loops over hydrophobic residues. Residues which are a potential source of instability and heterogeneity are also mutated even if there are found in the CDRs. That will include exposed methionines as sulfoxide formation can result from oxygen radicals, proteolytic cleavage of acid labile bonds such as those of the Asp-Pro dipeptide (*Drug Dev. Res.* 61:137, 2004), deamidation sites found with an exposed asparagine residue followed by a small amino acid, such as Gly, Ser, Ala, H is, Asn or Cys (*J. Chromatog.* 837:35, 2006) and N-glycosylation sites, such as the Asn-X-Ser/Thr site. Typically, exposed methionines will be substituted by a Leu, exposed asparagines will be replaced by a glutamine or by an aspartate, or the subsequent residue will be changed. For the glycosylation site (Asn-X-Ser/Thr), either the Asn or the Ser/Thr residue will be changed.

The resulting composite antibody sequence is checked for the presence of known B cell or linear T-cell epitopes. A search is performed, for example, with the publicly available Immune Epitope Data Base (IEDB) (*PLOS Biol.* (2005) 3(3)e91). If a known epitope is found within the composite sequence, another set of human sequences is retrieved and substituted. Thus, unlike the resurfacing method of U.S. Patent No. 5,639,641, both B-cell-mediated and T-cell-mediated immunogenic responses are addressed by the method. The method also avoids the issue of loss of activity that is sometimes observed with CDR grafting (U.S. Patent No. 5,530,101). In addition, stability and solubility issues also are considered in the engineering and selection process, resulting in an antibody that is optimized for low immunogenicity, high antigen affinity and improved biophysical properties.

In some embodiments, de-immunization can be used to decrease the immunogenicity of and antibody, or antigen binding fragment thereof. As used herein, the term "de-immunization" includes alteration of an antibody, or antigen binding fragment thereof, to modify T cell epitopes (*see, e.g.*, International Publication Nos. WO9852976A1, WO0034317A2). For example, VH and VL sequences from the starting antibody may be analyzed and a human T cell epitope "map" may be generated from each V region showing the location of epitopes in relation to complementarity-determining regions (CDRs) and other key residues within the sequence. Individual T cell epitopes from the T cell epitope map are analyzed in order to identify alternative amino acid substitutions with a low risk of altering activity of the final antibody. A range of alternative VH and VL sequences are designed comprising combinations of amino acid substitutions and these sequences are subsequently incorporated into a range of PAI-1-specific antibodies or fragments thereof for use in the diagnostic and treatment methods disclosed herein, which are then tested for function. Typically, between 12 and 24 variant antibodies are generated and tested. Complete heavy and light chain genes comprising

modified V and human C regions are then cloned into expression vectors and the subsequent plasmids introduced into cell lines for the production of whole antibody. The antibodies are then compared in appropriate biochemical and biological assays, and the optimal variant is identified.

ii) Effector Functions and Fc Modifications

Anti-PAI-1 antibodies disclosed herein may comprise an antibody constant region (e.g. an IgG constant region, a human IgG constant region, a human IgG1 or IgG4 constant region) which mediates one or more effector functions. For example, binding of the C1 component of complement to an antibody constant region may activate the complement system. Activation of complement is important in the opsonization and lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and may also be involved in autoimmune hypersensitivity. Further, antibodies bind to receptors on various cells via the Fc region, with a Fc receptor binding site on the antibody Fc region binding to a Fc receptor (FcR) on a cell. There are a number of Fc receptors which are specific for different classes of antibody, including IgG (gamma receptors), IgE (epsilon receptors), IgA (alpha receptors) and IgM (mu receptors). Binding of antibody to Fc receptors on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated target cells by killer cells (called antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, or ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer and control of immunoglobulin production. In certain embodiments, the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein bind to an Fc-gamma receptor. In alternative embodiments, anti-PAI-1 antibodies disclosed herein may comprise a constant region which is devoid of one or more effector functions (e.g., ADCC activity) or is unable to bind Fc receptor.

Certain embodiments disclosed herein include anti-PAI-1 antibodies in which at least one amino acid in one or more of the constant region domains has been deleted or otherwise altered so as to provide desired biochemical characteristics such as reduced or enhanced effector functions, the ability to non-covalently dimerize, increased ability to localize at a particular site in the body (*e.g.*, the site of a tumor or to a particular organ), reduced serum half-life, or increased serum half-life when compared with a whole, unaltered antibody of approximately the same immunogenicity. For example, certain antibodies, or fragments thereof, for use in the diagnostic and treatment methods described herein are domain deleted antibodies which comprise a polypeptide chain similar to an immunoglobulin heavy chain, but which lack at least a portion of one or more heavy chain domains. For instance, in certain antibodies, one entire domain of the constant region of the modified antibody will be deleted, for example, all or part of the CH2 domain will be deleted.

In certain other embodiments, anti-PAI-1 antibodies comprise constant regions derived from different antibody isotypes (*e.g.*, constant regions from two or more of a human IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4). In other embodiments, anti-PAI-1 antibodies comprises a chimeric hinge (*i.e.*, a hinge comprising hinge portions derived from hinge domains of different antibody isotypes, e.g., an upper hinge domain from an IgG4 molecule and an IgG1 middle hinge domain). In one embodiment, an anti-PAI-1 antibody comprises an Fc region or portion thereof from a human IgG4 molecule and a Ser228Pro mutation (Kabat numbering) in the core hinge region of the molecule.

In certain anti-PAI-1 antibodies, the Fc portion may be mutated to increase or decrease effector function using techniques known in the art. For example, the deletion or inactivation (through point mutations or other means) of a constant region domain may reduce Fc receptor binding of the circulating modified antibody thereby increasing tumor localization. In other cases it may be that constant region modifications consistent with the instant invention moderate complement binding and thus reduce the serum half-life and nonspecific association of a conjugated cytotoxin. Yet other modifications of the constant region may be used to modify disulfide linkages or oligosaccharide moieties that allow for enhanced localization due to increased antigen specificity or flexibility. The resulting physiological profile, bioavailability and other biochemical effects of the modifications, such as tumor localization, biodistribution and serum half-life, may easily be measured and quantified using well know immunological techniques without undue experimentation.

In certain embodiments, an Fc domain employed in an antibody disclosed herein is an Fc variant. As used herein, the term "Fc variant" refers to an Fc domain having at least one amino acid substitution relative to the wild-type Fc domain from which said Fc domain is derived. For example, wherein the Fc domain is derived from a human IgG1 antibody, the Fc variant of said human IgG1 Fc domain comprises at least one amino acid substitution relative to said Fc domain.

The amino acid substitution(s) of an Fc variant may be located at any position (i.e., any EU convention amino acid position) within the Fc domain. In one embodiment, the Fc variant comprises a substitution at an amino acid position located in a hinge domain or portion thereof. In another embodiment, the Fc variant comprises a substitution at an amino acid position located in a CH2 domain or portion thereof. In another embodiment, the Fc variant comprises a substitution at an amino acid position located in a CH3 domain or portion thereof. In another embodiment, the Fc variant comprises a substitution at an amino acid position located in a CH4 domain or portion thereof.

The antibodies disclosed herein may employ any art-recognized Fc variant which is known to impart an improvement (*e.g.*, reduction or enhancement) in effector function or FcR binding. Said Fc variants may include, for example, any one of the amino acid substitutions disclosed in International PCT Publications WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2,

WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, and WO06/085967A2 or U.S. Pat. Nos. 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; and 7,083,784, each of which is incorporated by reference herein. In one exemplary embodiment, an antibody disclosed herein may comprise an Fc variant comprising an amino acid substitution at EU position 268 (e.g., H268D or H268E). In another exemplary embodiment, an antibody disclosed herein may comprise an amino acid substitution at EU position 239 (*e.g.*, S239D or S239E) or EU position 332 (*e.g.*, I332D or I332Q).

In certain embodiments, an antibody disclosed herein may comprise an Fc variant comprising an amino acid substitution which alters the antigen-independent effector functions of the antibody, in particular the circulating half-life of the antibody. Such antibodies exhibit either increased or decreased binding to FcRn when compared to antibodies lacking these substitutions, therefore, have an increased or decreased half-life in serum, respectively. Fc variants with improved affinity for FcRn are anticipated to have longer serum half-lives, and such molecules have useful applications in methods of treating mammals where long half-life of the administered antibody is desired, e.g., to treat a chronic disease or disorder. In contrast, Fc variants with decreased FcRn binding affinity are expected to have shorter half-lives, and such molecules are also useful, for example, for administration to a mammal where a shortened circulation time may be advantageous, e.g. for in vivo diagnostic imaging or in situations where the starting antibody has toxic side effects when present in the circulation for prolonged periods. Fc variants with decreased FcRn binding affinity are also less likely to cross the placenta and, thus, are also useful in the treatment of diseases or disorders in pregnant women. In addition, other applications in which reduced FcRn binding affinity may be desired include those applications in which localization the brain, kidney, or liver is desired. In one exemplary embodiment, the altered antibodies disclosed herein exhibit reduced transport across the epithelium of kidney glomeruli from the vasculature. In another embodiment, the altered antibodies disclosed herein exhibit reduced transport across the blood brain barrier (BBB) from the brain, into the vascular space. In one embodiment, an antibody with altered FcRn binding comprises an Fc domain having one or more amino acid substitutions within the "FcRn binding loop" of an Fc domain. The FcRn binding loop is comprised of amino acid residues 280-299 (according to Kabat numbering). Exemplary amino acid substitutions which altered FcRn binding activity are disclosed in International PCT Publication No. WO05/047327 which is incorporated by reference herein. In certain exemplary embodiments, the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein comprise an Fc domain having

one or more of the following substitutions: V284E, H285E, N286D, K290E and S304D (Kabat numbering).

In other embodiments, antibodies, for use in the diagnostic and treatment methods described herein have a constant region, e.g., an IgG1 or IgG4 heavy chain constant region, which is altered to reduce or eliminate glycosylation. For example, an antibody disclosed herein may also comprise an Fc variant comprising an amino acid substitution which alters the glycosylation of the antibody. For example, said Fc variant may have reduced glycosylation (e.g., N- or O-linked glycosylation). In exemplary embodiments, the Fc variant comprises reduced glycosylation of the N-linked glycan normally found at amino acid position 297 (EU numbering). In another embodiment, the antibody has an amino acid substitution near or within a glycosylation motif, for example, an N-linked glycosylation motif that contains the amino acid sequence NXT or NXS. In a particular embodiment, the antibody comprises an Fc variant with an amino acid substitution at amino acid position 228 or 299 (EU numbering). In more particular embodiments, the antibody comprises an IgG1 or IgG4 constant region comprising an S228P and a T299A mutation (EU numbering).

Exemplary amino acid substitutions which confer reduce or altered glycosylation are disclosed in International PCT Publication No. WO05/018572, which is incorporated by reference herein. In certain embodiments, the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein are modified to eliminate glycosylation. Such antibodies, or fragments thereof, may be referred to as "agly" antibodies, or fragments thereof, (e.g. "agly" antibodies). While not being bound by theory, it is believed that "agly" antibodies, or fragments thereof, may have an improved safety and stability profile in vivo. Exemplary agly antibodies, or fragments thereof, comprise an aglycosylated Fc region of an IgG4 antibody which is devoid of Fc-effector function thereby eliminating the potential for Fc mediated toxicity to the normal vital organs that express PAI-1. In yet other embodiments, antibodies, or fragments thereof, disclosed herein comprise an altered glycan. For example, the antibody may have a reduced number of fucose residues on an N-glycan at Asn297 of the Fc region, i.e., is afucosylated. In another embodiment, the antibody may have an altered number of sialic acid residues on the N-glycan at Asn297 of the Fc region.

iii) Covalent Attachment

Anti-PAI-1 antibodies disclosed herein may be modified, e.g., by the covalent attachment of a molecule to the antibody such that covalent attachment does not prevent the antibody from specifically binding to its cognate epitope. For example, but not by way of limitation, the antibodies, or fragments thereof, disclosed herein may be modified by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. Any of numerous chemical modifications

may be carried out by known techniques, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation, etc. Additionally, the derivative may contain one or more non-classical amino acids.

Antibodies, or fragments thereof, disclosed herein may further be recombinantly fused to a heterologous polypeptide at the N- or C-terminus or chemically conjugated (including covalent and non-covalent conjugations) to polypeptides or other compositions. For example, anti-PAI-1 antibodies may be recombinantly fused or conjugated to molecules useful as labels in detection assays and effector molecules such as heterologous polypeptides, drugs, radionuclides, or toxins. *See, e.g.*, International PCT publication Nos. WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; U.S. Pat. No. 5,314,995; and EP 396,387.

Anti-PAI-1 antibodies may be fused to heterologous polypeptides to increase the in vivo half-life or for use in immunoassays using methods known in the art. For example, in one embodiment, PEG can be conjugated to the anti-PAI-1 antibodies disclosed herein to increase their half-life in vivo. (Leong, S. R., *et al., Cytokine* 16:106, 2001; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531, 2002; or Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512, 2002).

Moreover, anti-PAI-1 antibodies disclosed herein can be fused to marker sequences, such as a peptide to facilitate their purification or detection. In certain embodiments, the marker amino acid sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989, for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Other peptide tags useful for purification include, but are not limited to, the "HA" tag, which corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson *et al.*, Cell 37:767, 1984) and the "flag" tag.

Anti-PAI-1 antibodies disclosed herein may be used in non-conjugated form or may be conjugated to at least one of a variety of molecules, e.g., to improve the therapeutic properties of the molecule, to facilitate target detection, or for imaging or therapy of the patient. Anti-PAI-1 antibodies disclosed herein can be labeled or conjugated either before or after purification, when purification is performed. In particular, anti- PAI-1 antibodies disclosed herein may be conjugated to therapeutic agents, prodrugs, peptides, proteins, enzymes, viruses, lipids, biological response modifiers, pharmaceutical agents, or PEG.

The present invention further encompasses anti-PAI-1 antibodies conjugated to a diagnostic or therapeutic agent. The anti-PAI-1 antibodies can be used diagnostically to, for example, monitor the development or progression of a immune cell disorder (e.g., CLL) as part of a clinical testing procedure to, e.g., determine the efficacy of a given treatment or prevention regimen. Detection can be facilitated by coupling the anti-PAI-1 antibodies to a detectable substance. Examples of detectable

substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, radioactive materials, positron emitting metals using various positron emission tomographies, and nonradioactive paramagnetic metal ions. See, for example, U.S. Pat. No. 4,741,900 for metal ions which can be conjugated to antibodies for use as diagnostics according to the present invention. Non-limiting examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; non-limiting examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; non-limiting examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; a non-limiting example of a luminescent material includes luminol; non-limiting examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and non-limiting examples of suitable radioactive material include 125I, 131I, 111In or 99Tc.

Anti-PAI-1 antibodies for use in the diagnostic and treatment methods disclosed herein may be conjugated to cytotoxins (such as radioisotopes, cytotoxic drugs, or toxins) therapeutic agents, cytostatic agents, biological toxins, prodrugs, peptides, proteins, enzymes, viruses, lipids, biological response modifiers, pharmaceutical agents, immunologically active ligands (e.g., lymphokines or other antibodies wherein the resulting molecule binds to both the neoplastic cell and an effector cell such as a T cell), or PEG.

In another embodiment, an anti-PAI-1 antibody for use in the diagnostic and treatment methods disclosed herein can be conjugated to a molecule that decreases tumor cell growth. In other embodiments, the disclosed compositions may comprise antibodies, or fragments thereof, coupled to drugs or prodrugs. Still other embodiments disclosed herein comprise the use of antibodies, or fragments thereof, conjugated to specific biotoxins or their cytotoxic fragments such as ricin, gelonin, Pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin. The selection of which conjugated or unconjugated antibody to use will depend on the type and stage of cancer, use of adjunct treatment (e.g., chemotherapy or external radiation) and patient condition. It will be appreciated that one skilled in the art could readily make such a selection in view of the teachings herein.

It will be appreciated that, in previous studies, anti-tumor antibodies labeled with isotopes have been used successfully to destroy tumor cells in animal models, and in some cases in humans. Exemplary radioisotopes include: 90Y, 125I, 131I, 123I, 111In, 105Rh, 153Sm, 67Cu, 67Ga, 166Ho, 177Lu, 186Re and 188Re. The radionuclides act by producing ionizing radiation which causes multiple strand breaks in nuclear DNA, leading to cell death. The isotopes used to produce therapeutic conjugates typically produce high energy alpha- or beta-particles which have a short path length. Such radionuclides kill cells to which they are in close proximity, for example neoplastic cells to which the conjugate has attached or has entered. They have little or no effect on non-localized cells.

Radionuclides are essentially non-immunogenic.

IV. Expression of Anti-PAI-1 Antibodies, or Antigen Binding Fragments Thereof

Following manipulation of the isolated genetic material to provide anti-PAI-1 antibodies disclosed herein as set forth above, the genes are typically inserted in an expression vector for introduction into host cells that may be used to produce the desired quantity of the claimed antibodies, or fragments thereof.

In other embodiments the anti-PAI-1 antibodies, or fragments thereof, disclosed herein may be expressed using polycistronic constructs. In such expression systems, multiple gene products of interest such as heavy and light chains of antibodies may be produced from a single polycistronic construct. These systems advantageously use an internal ribosome entry site (IRES) to provide relatively high levels of polypeptides disclosed herein in eukaryotic host cells. Compatible IRES sequences are disclosed in U.S. Pat. No. 6,193,980, that is incorporated by reference herein. Those skilled in the art will appreciate that such expression systems may be used to effectively produce the full range of polypeptides disclosed in the instant application.

In one embodiment, the host cell line used for antibody expression is of mammalian origin; those skilled in the art can determine particular host cell lines which are best suited for the desired gene product to be expressed therein. Exemplary host cell lines include, but are not limited to, DG44 and DUXB11 (Chinese Hamster Ovary lines, DHFR minus), HELA (human cervical carcinoma), CVI (monkey kidney line), COS (a derivative of CVI with SV40 T antigen), R1610 (Chinese hamster fibroblast) BALBC/3T3 (mouse fibroblast), HAK (hamster kidney line), SP2/O (mouse myeloma), BFA-1c1BPT (bovine endothelial cells), RAJI (human lymphocyte), 293 (human kidney). In one embodiment, the cell line provides for altered glycosylation, e.g., afucosylation, of the antibodyexpressed therefrom (e.g., PER.C6.RTM. (Crucell) or FUT8-knock-out CHO cell lines (Potelligent.RTM. Cells) (Biowa, Princeton, N.J.)). In one embodiment NS0 cells may be used. CHO cells can be used in certain specific embodiments. Host cell lines are typically available from commercial services, the American Tissue Culture Collection or from published literature.

In vitro production allows scale-up to give large amounts of the desired polypeptides. Techniques for mammalian cell cultivation under tissue culture conditions are known in the art and include homogeneous suspension culture, e.g. in an airlift reactor or in a continuous stirrer reactor, or immobilized or entrapped cell culture, e.g. in hollow fibers, microcapsules, on agarose microbeads or ceramic cartridges. If necessary or desired, the solutions of polypeptides can be purified by the customary chromatography methods, for example gel filtration, ion-exchange chromatography, chromatography over DEAE-cellulose or (immuno-)affinity chromatography.

ADVANCE E-MAIL CORRECTED VERSION PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

DEGIULIO, James V.
McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP
300 South Wacker Drive, Suite 3100
Chicago, IL 60606
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
07 October 2014 (07.10.2014)

Applicant's or agent's file reference
13-596-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2014/050896

International filing date *(day/month/year)*
13 August 2014 (13.08.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address
MORGAN, Chris
c/o Sanofi
55 Corporate Drive
Mail Code: 55A-505A
Bridgewater, NJ 08807
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
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
MORGAN, Christopher Ryan
c/o Sanofi
55 Corporate Drive
Mail Code: 55A-505A
Bridgewater, NJ 08807
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
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

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Baechler Francois
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

ADVANCE E-MAIL CORRECTED VERSION PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

DEGIULIO, James V.
McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP
300 South Wacker Drive, Suite 3100
Chicago, IL 60606
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
07 October 2014 (07.10.2014)

Applicant's or agent's file reference
13-596-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2014/050896

International filing date *(day/month/year)*
13 August 2014 (13.08.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address
GRAIHE, Patrick
c/o Sanofi
54, rue La Boétie
F-75008 Paris
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
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
GRAILHE, Patrick
c/o Sanofi
54, rue La Boétie
F-75008 Paris
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
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

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Authorized officer
Baechler Francois
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

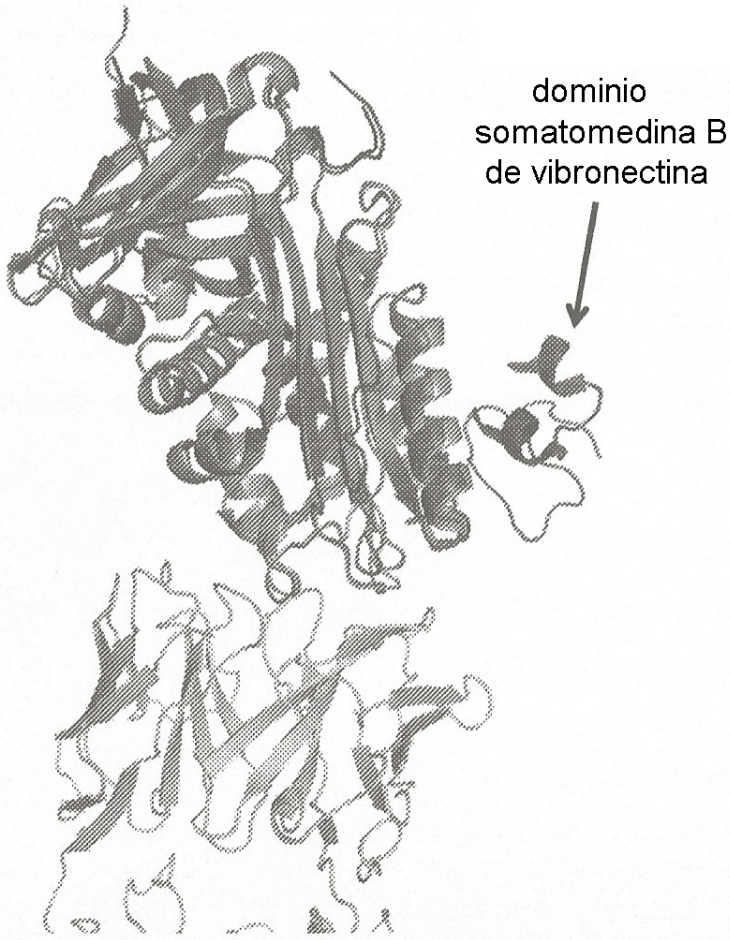


FIG. 47



Total: 93,5% Cobertura
4,44 Redundancia

FIG. 48

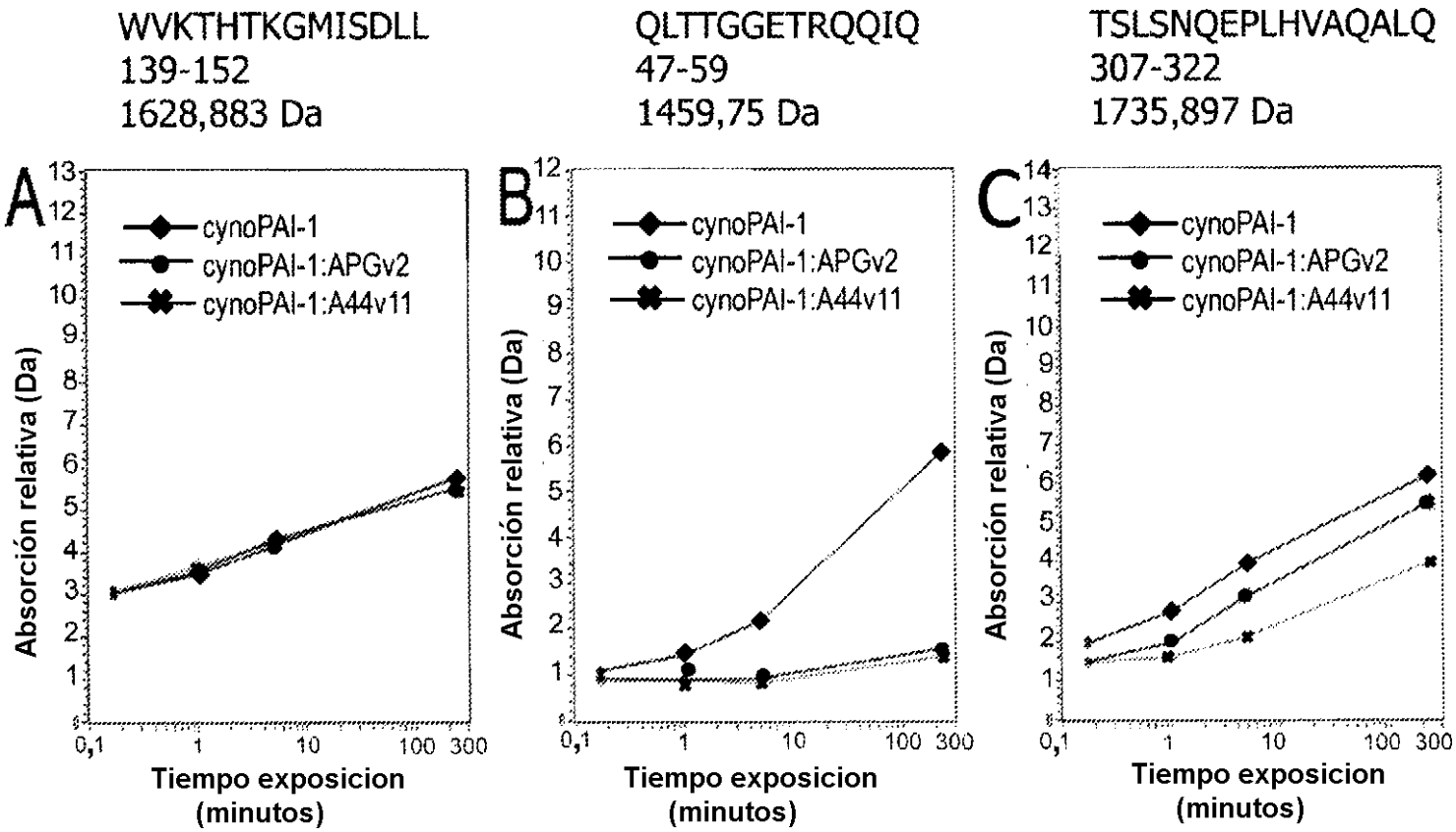

WVKTHTKGMISDLL
139-152
1628,883 Da
QLTTGGETRQQIQ
47-59
1459,75 Da
TSLSNQEPLHVAQALQ
307-322
1735,897 Da
A
B
C
cynoPAI-1
cynoPAI-1:APGv2
cynoPAI-1:A44v11
Absorción relativa (Da)
Tiempo exposicion (minutos)
0,1
1
10
100
300

FIG. 49

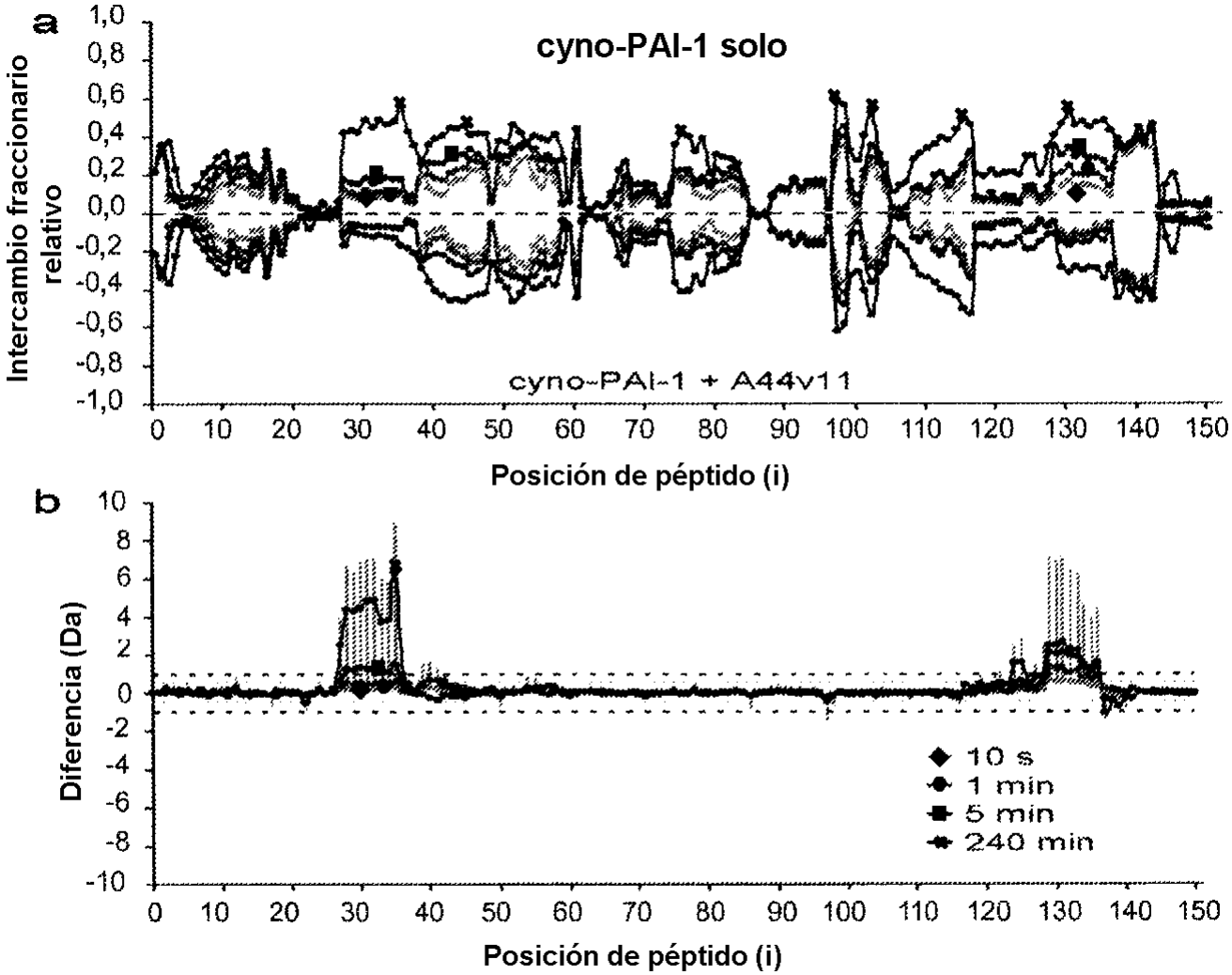

a
cyno-PAI-1 solo
Intercambio fraccionario relativo
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
cyno-PAI-1 + A44v11
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
Posición de péptido (i)
b
Diferencia (Da)
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
10 s
1 min
5 min
240 min
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
Posición de péptido (i)

FIG. 50

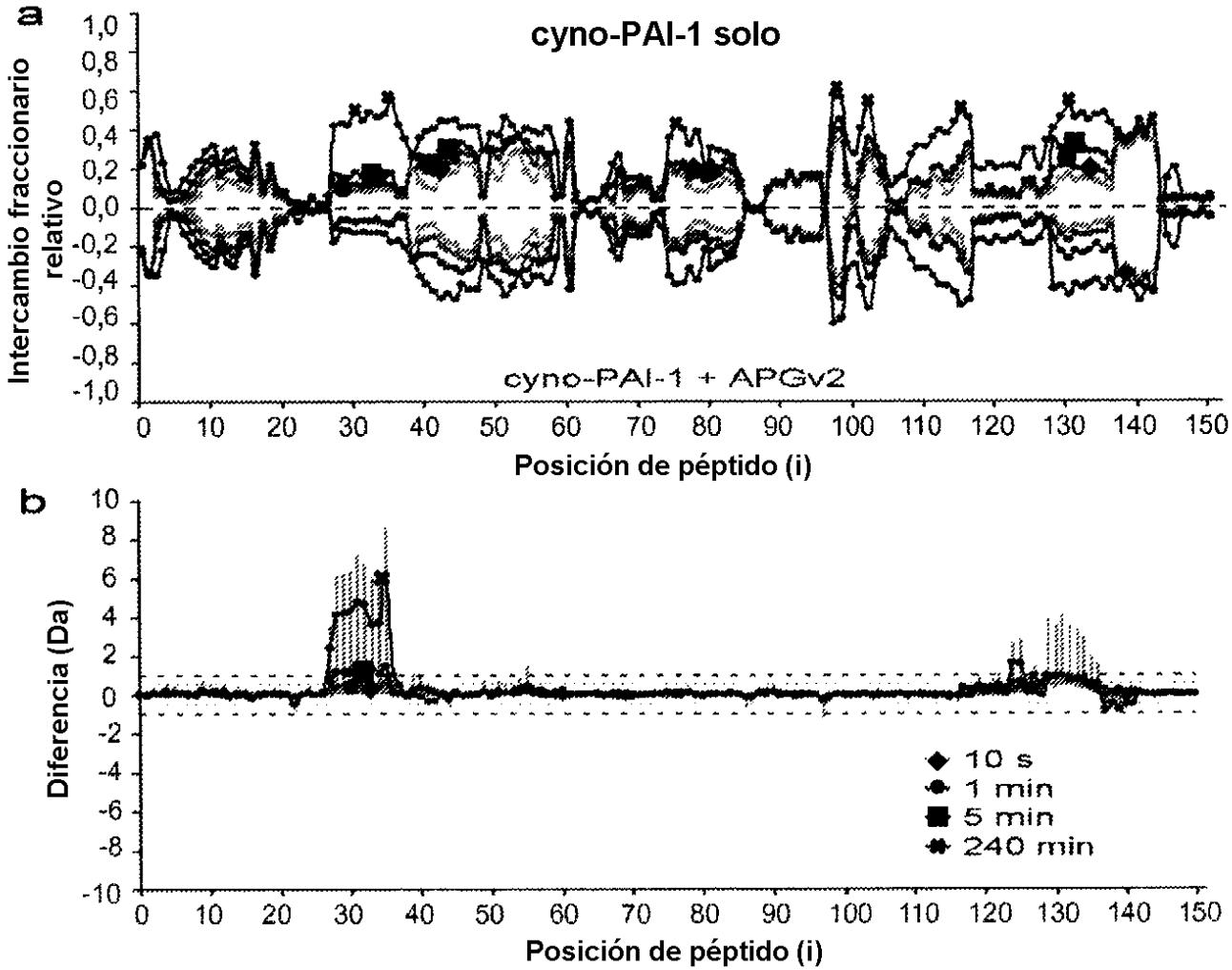

a
cyno-PAI-1 solo
Intercambio fraccionario relativo
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
cyno-PAI-1 + APGv2
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
Posición de péptido (i)
b
Diferencia (Da)
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
10 s
1 min
5 min
240 min
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
Posición de péptido (i)

FIG. 51

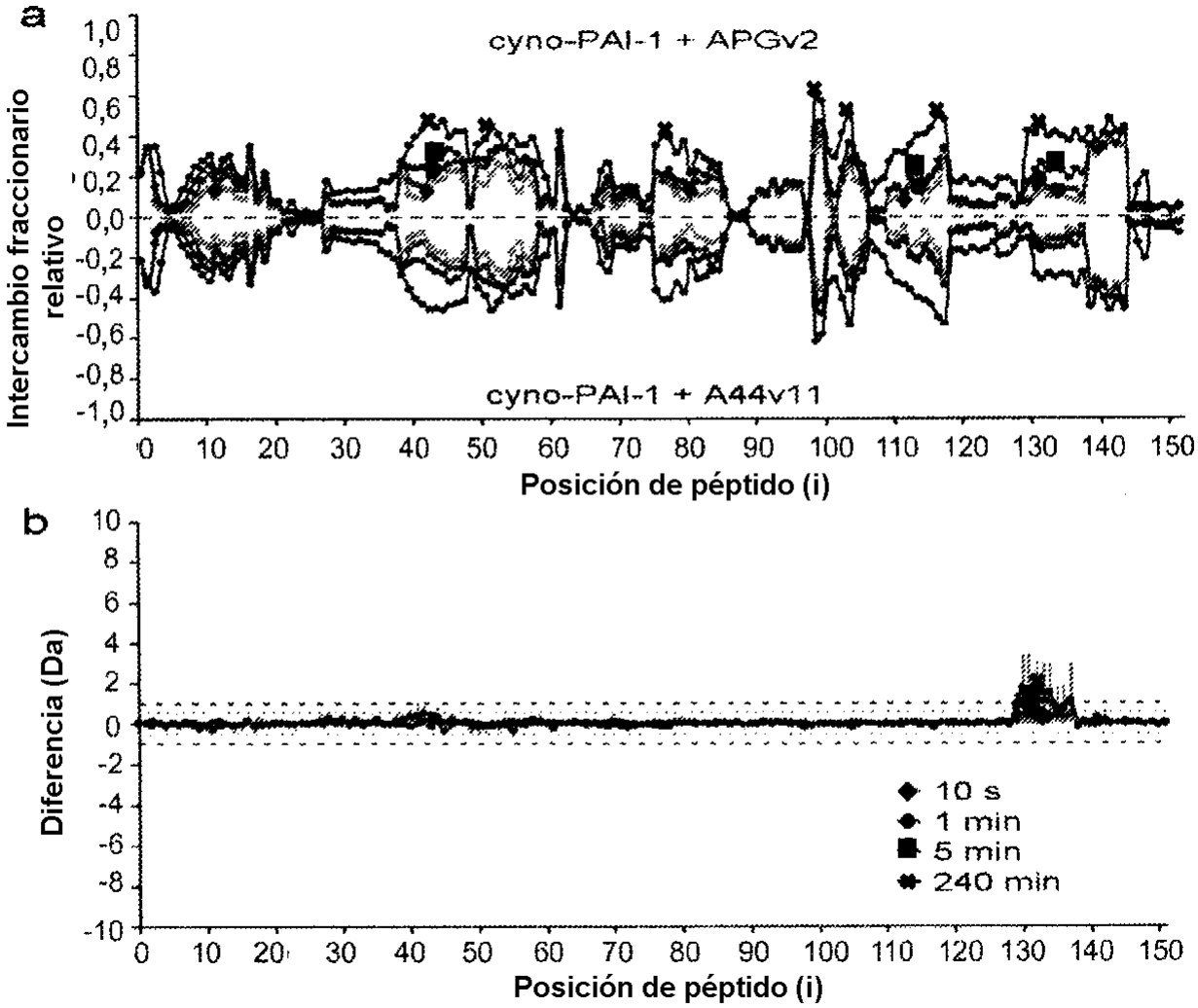

a
cyno-PAI-1 + APGv2
cyno-PAI-1 + A44v11
Intercambio fraccionario relativo
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
Posición de péptido (i)
b
Diferencia (Da)
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
10 s
1 min
5 min
240 min
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
Posición de péptido (i)

FIG. 52

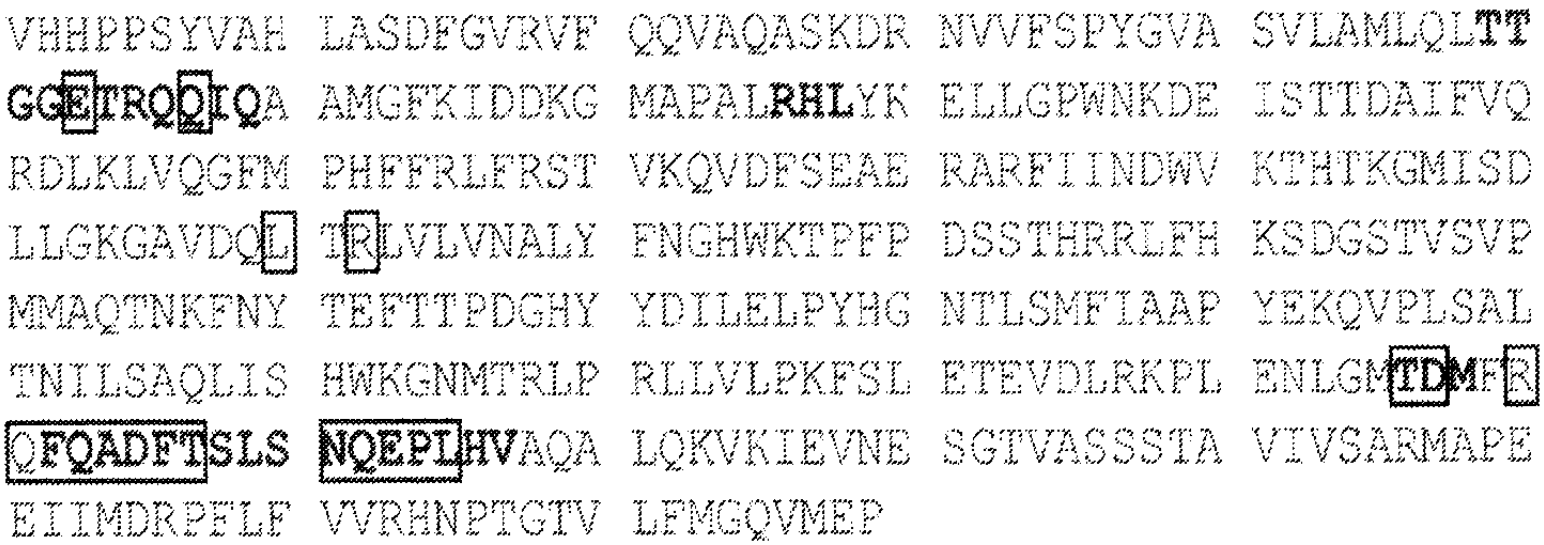

VHHPPSYVAH LASDEGVRVF QQVAQASKDR NVVFSPYGVA SVLAMLQLTT
GGETRQQIQA AMGFKIDDKG MAPALRHLYK ELLGPWNKDE ISTIDAIFVQ
RDLKLVQGFM PHFFRLFRST VKQVDFSEAE RARFIINDWV KTHTKGMISD
LLGKGAVDQL IRLVLVNALY FNGHWKTPFP DSSTHRRLFH KSDGSTVSVP
MMAQTNKFNY TEFTIPDGHY YDILELPYHG NTLSMFIAAP YEKQVPLSAL
TNILSAQLIS HWKGNMTRLP RLLVLPKFSL ETEVDLRKPL ENLGMTDMFR
QFQADFTSLS NQEPLHVAQA LQKVKIEVNE SGTVASSSTA VIVSARMAPE
EIIMDRPFLF VVRHNPTGTV LFMGQVMEP
NEGRITA = epítopo HX MS
= epítopo rayos X

FIG. 53

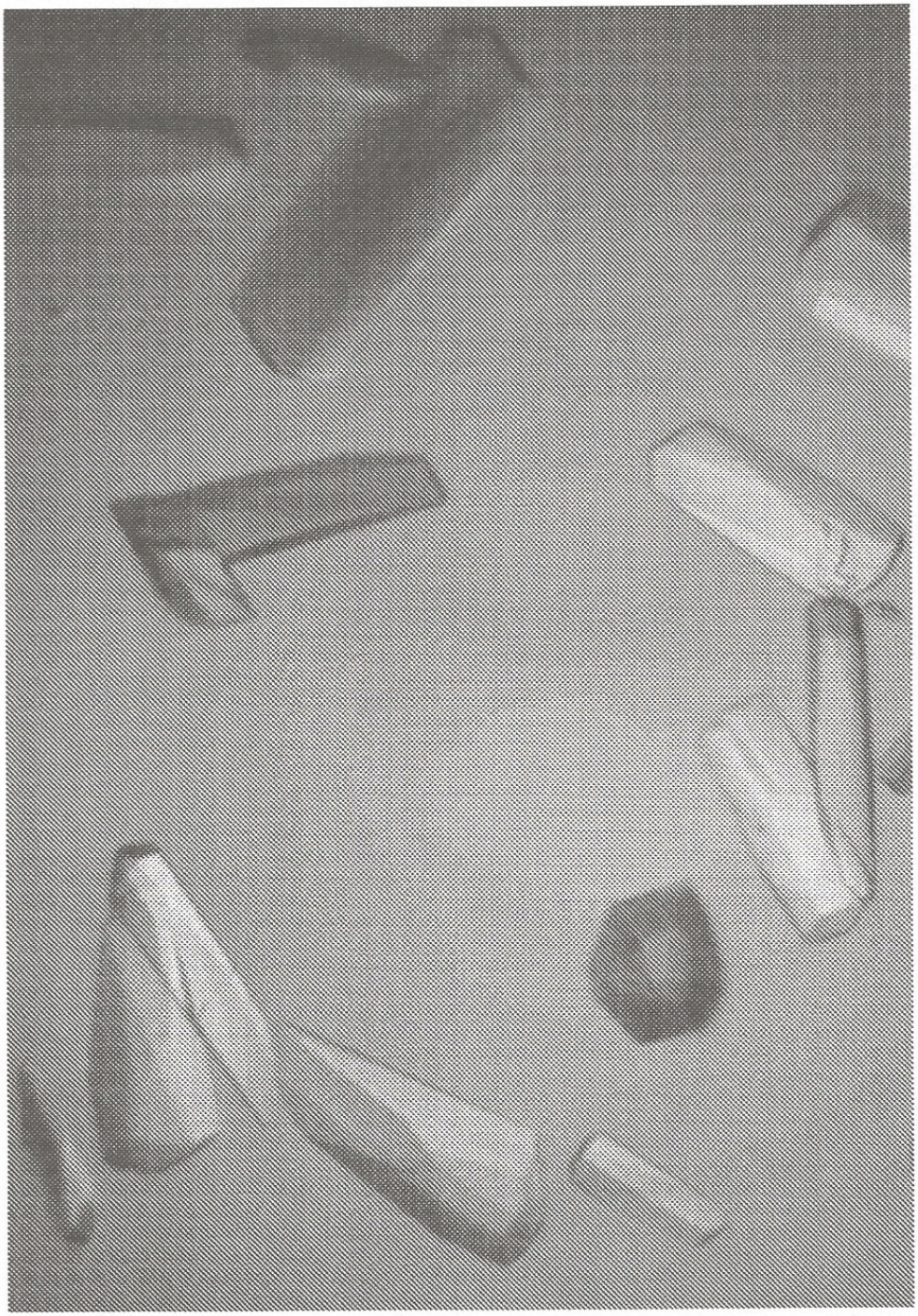


FIG. 40

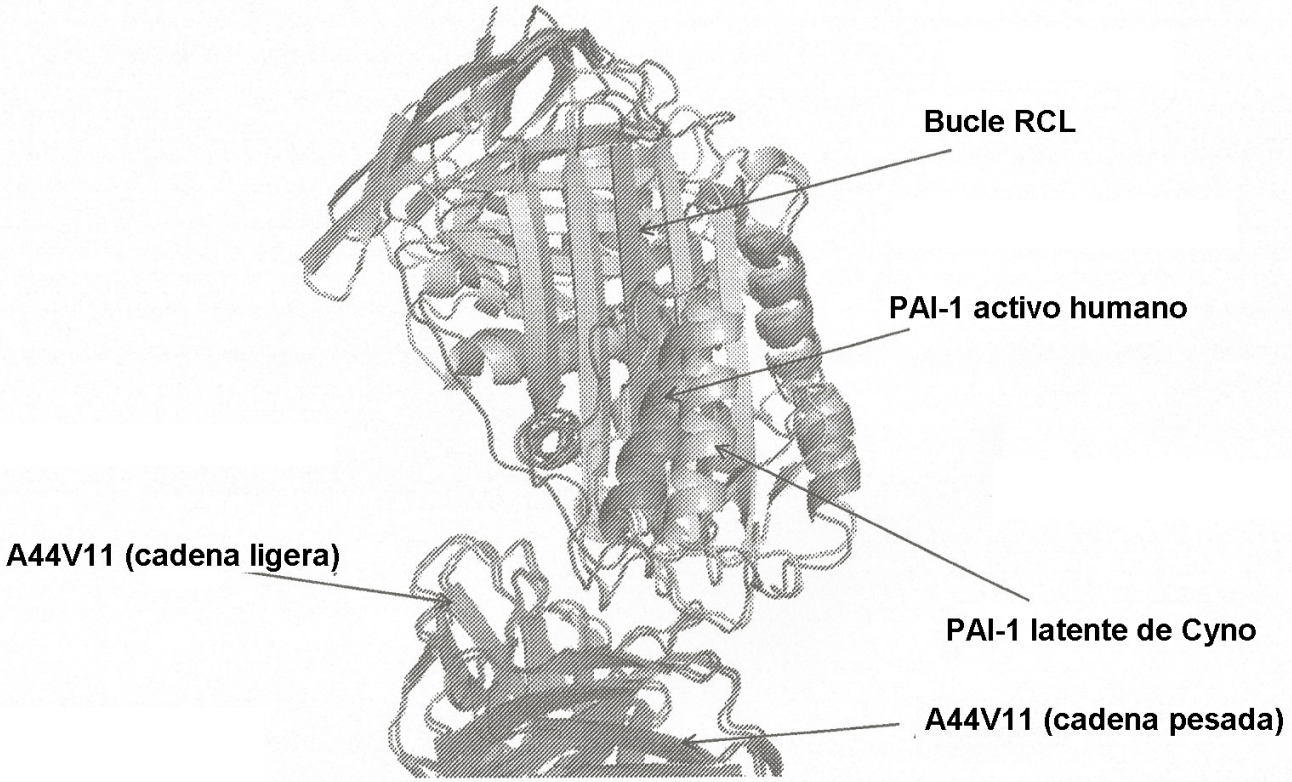

Bucle RCL
PAI-1 activo humano
A44V11 (cadena ligera)
PAI-1 latente de Cyno
A44V11 (cadena pesada)

FIG. 41

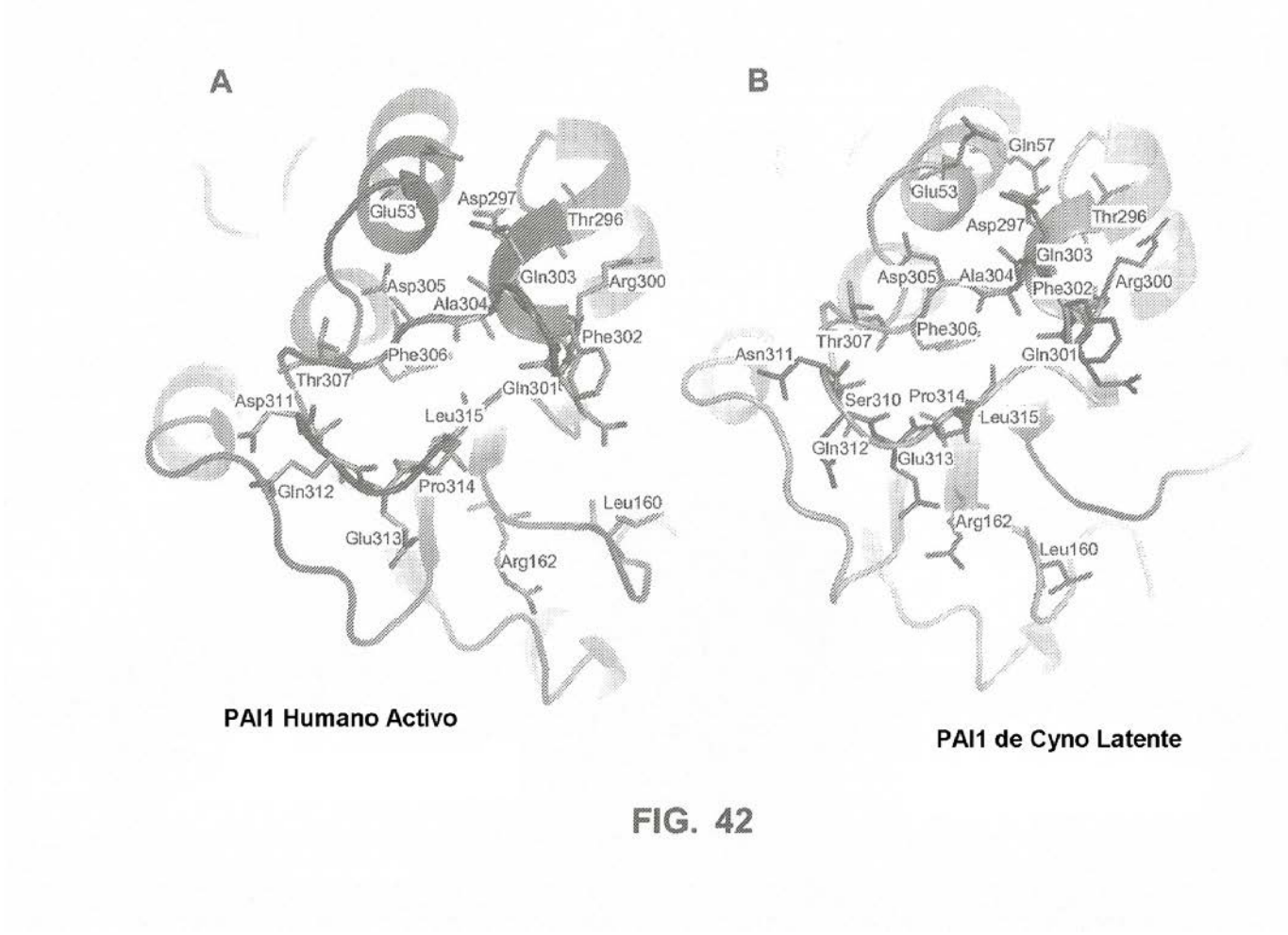

A
Glu53
Asp297
Thr296
Asp305
Gln303
Arg300
Ala304
Phe302
Phe306
Thr307
Gln301
Asp311
Leu315
Gln312
Pro314
Leu160
Glu313
Arg162
PAI1 Humano Activo
B
Gln57
Glu53
Asp297
Thr296
Gln303
Asp305
Ala304
Phe302
Arg300
Phe306
Thr307
Gln301
Asn311
Ser310
Pro314
Leu315
Gln312
Glu313
Arg162
Leu160
PAI1 de Cyno Latente

FIG. 42

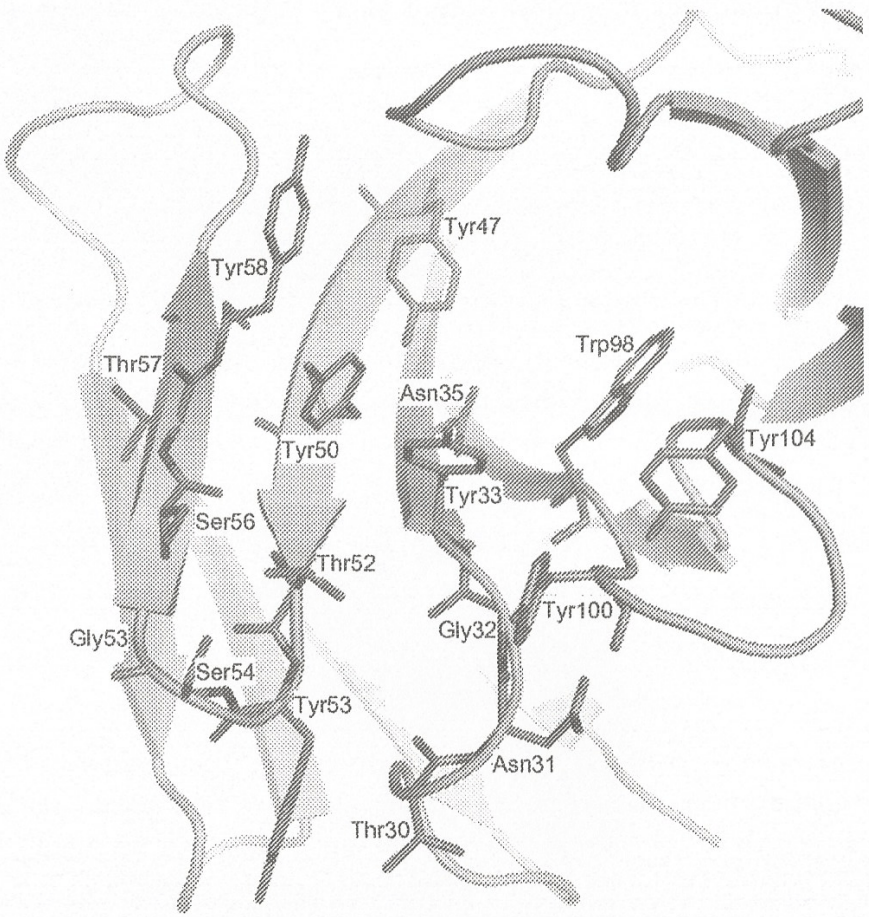

Tyr47
Tyr58
Trp98
Thr57
Asn35
Tyr104
Tyr50
Tyr33
Ser56
Thr52
Tyr100
Gly32
Gly53
Ser54
Tyr53
Asn31
Thr30

FIG. 43

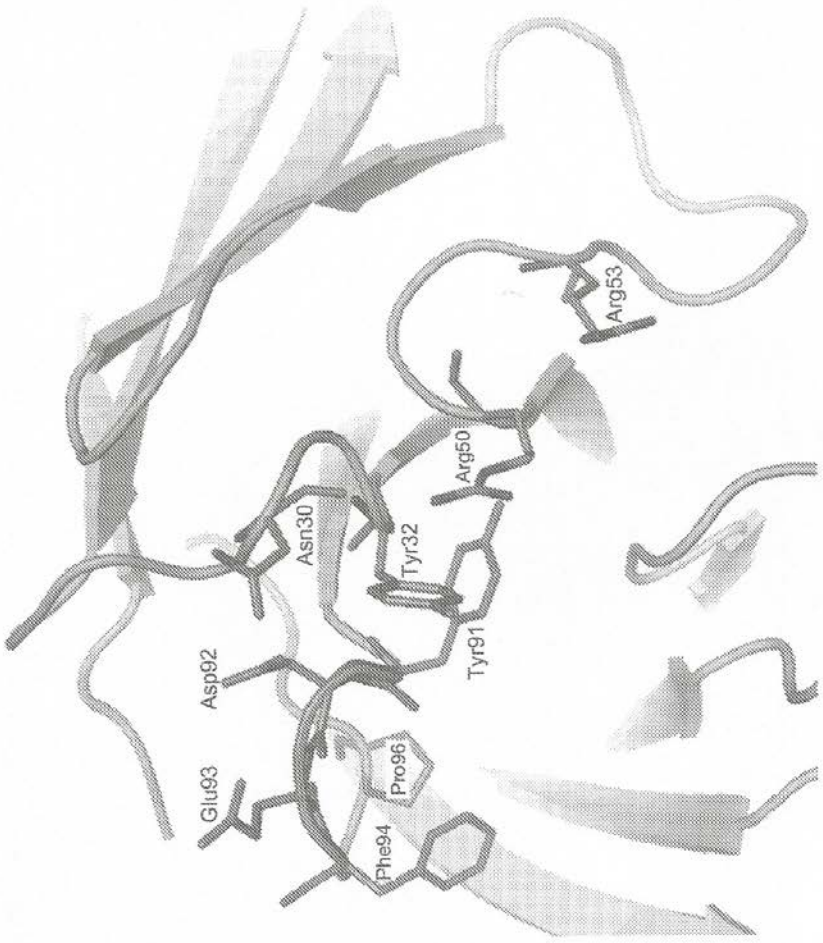


FIG. 44

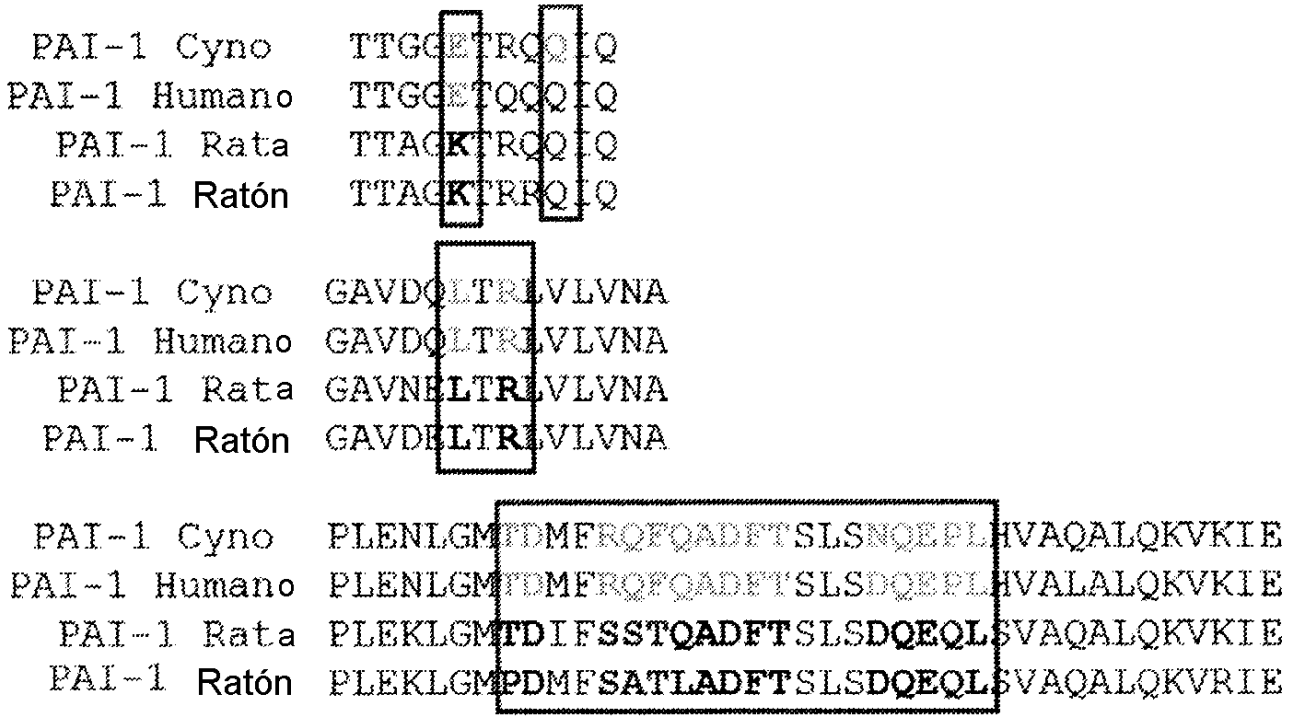

PAI-1 Cyno TTGGETRQQIQ
PAI-1 Humano TTGGETQQQIQ
PAI-1 Rata TTAGKTRQQIQ
PAI-1 Ratón TTAGKTRRQIQ
PAI-1 Cyno GAVDQLTRLVLVNA
PAI-1 Humano GAVDQLTRLVLVNA
PAI-1 Rata GAVNRLTRLVLVNA
PAI-1 Ratón GAVDRLTRLVLVNA
PAI-1 Cyno PLENLGMTDMFRQFQADFTSLSNQEPLHVAQALQKVKIE
PAI-1 Humano PLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQEPLHVALALQKVKIE
PAI-1 Rata PLEKLGMTDIFSSTQADFTSLSDQEQLSVAQALQKVKIE
PAI-1 Ratón PLEKLGMPDMFSATLADFTSLSDQEQLSVAQALQKVRIE

FIG. 45

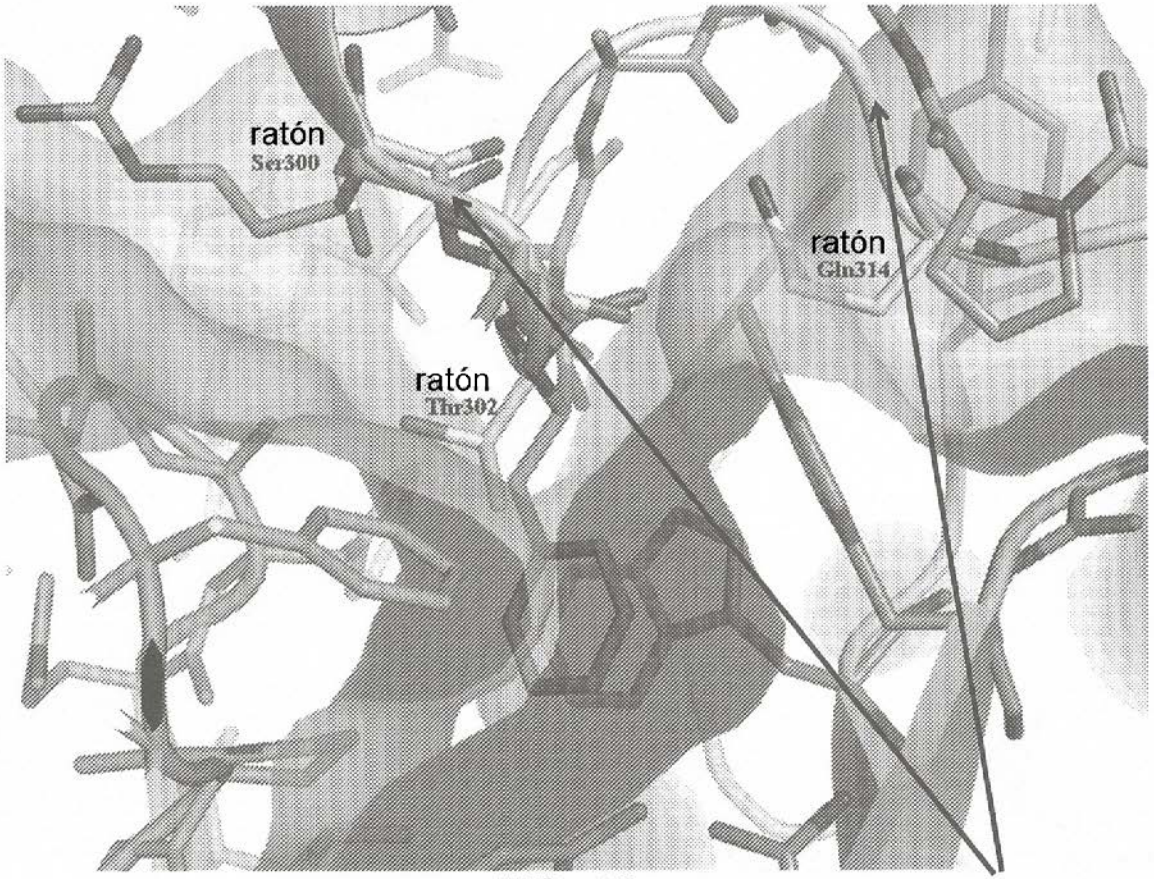


FIG. 46

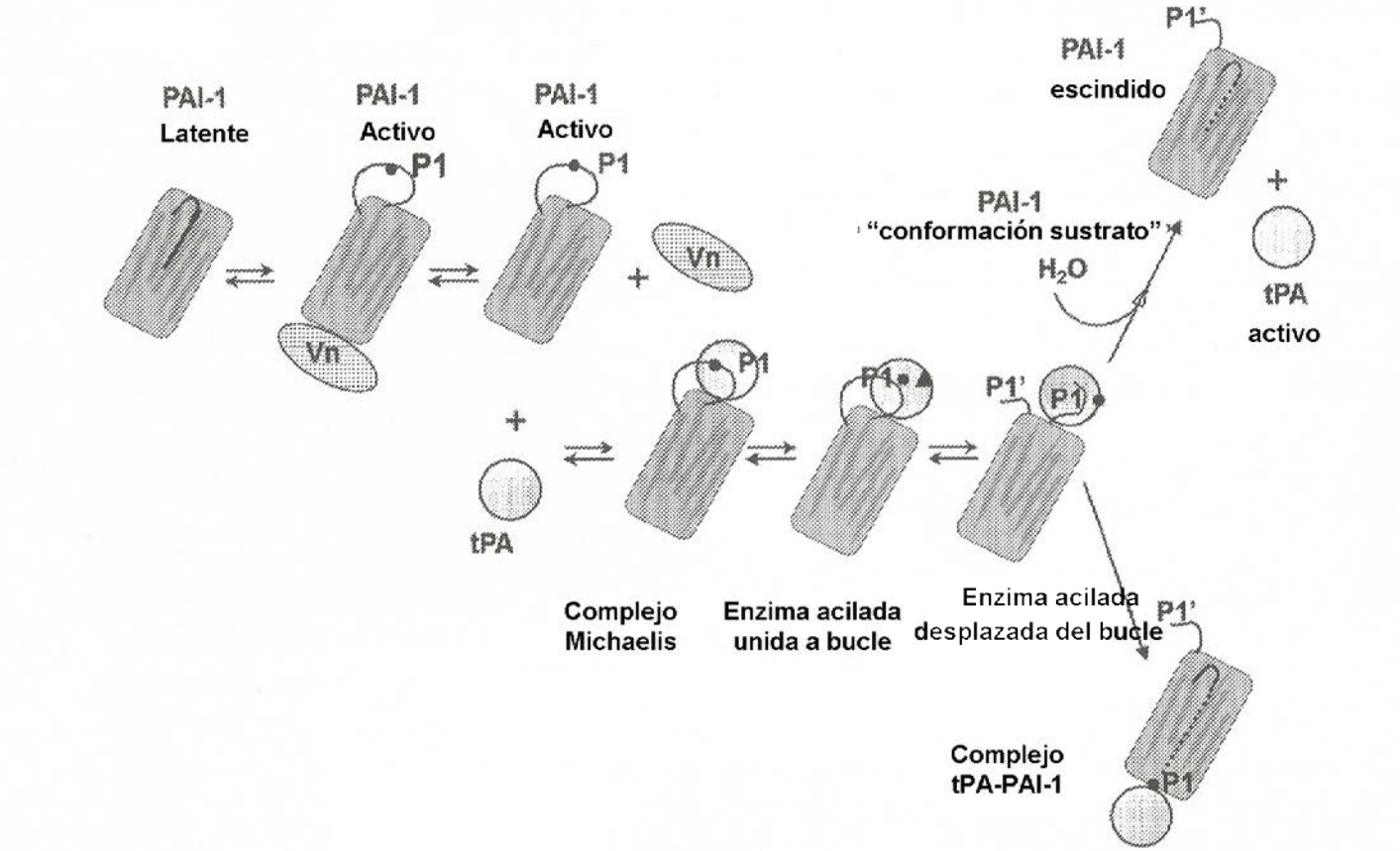

PAI-1
Latente
PAI-1
Activo
P1
PAI-1
Activo
P1
Vn
Vn
+
tPA
Complejo
Michaelis
P1
P1
Enzima acilada
unida a bucle
P1'
P1
Enzima acilada
desplazada del bucle
H_2O
PAI-1
"conformación sustrato"
P1'
PAI-1
escindido
+
tPA
activo
P1'
P1
Complejo
tPA-PAI-1

FIG. 1

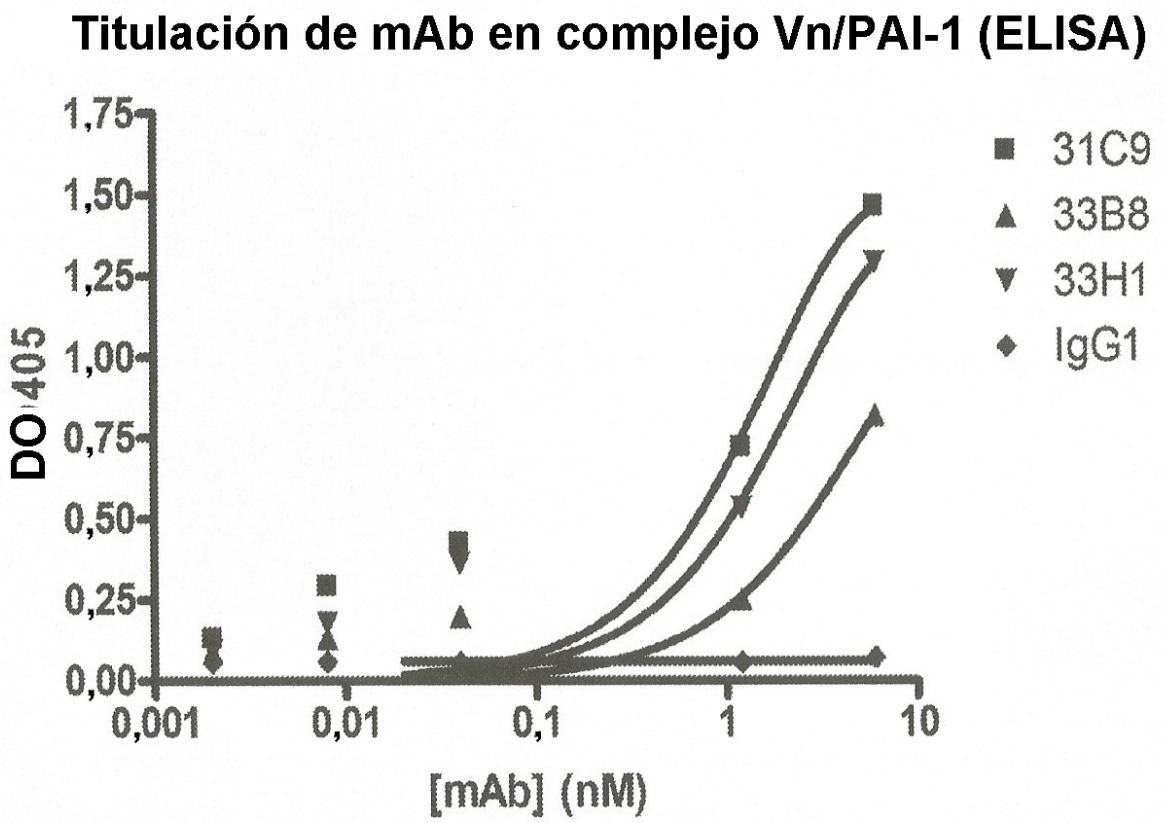

Titulación de mAb en complejo Vn/PAI-1 (ELISA)
DO 405
1,75
1,50
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
[mAb] (nM)
31C9
33B8
33H1
IgG1

FIG. 2

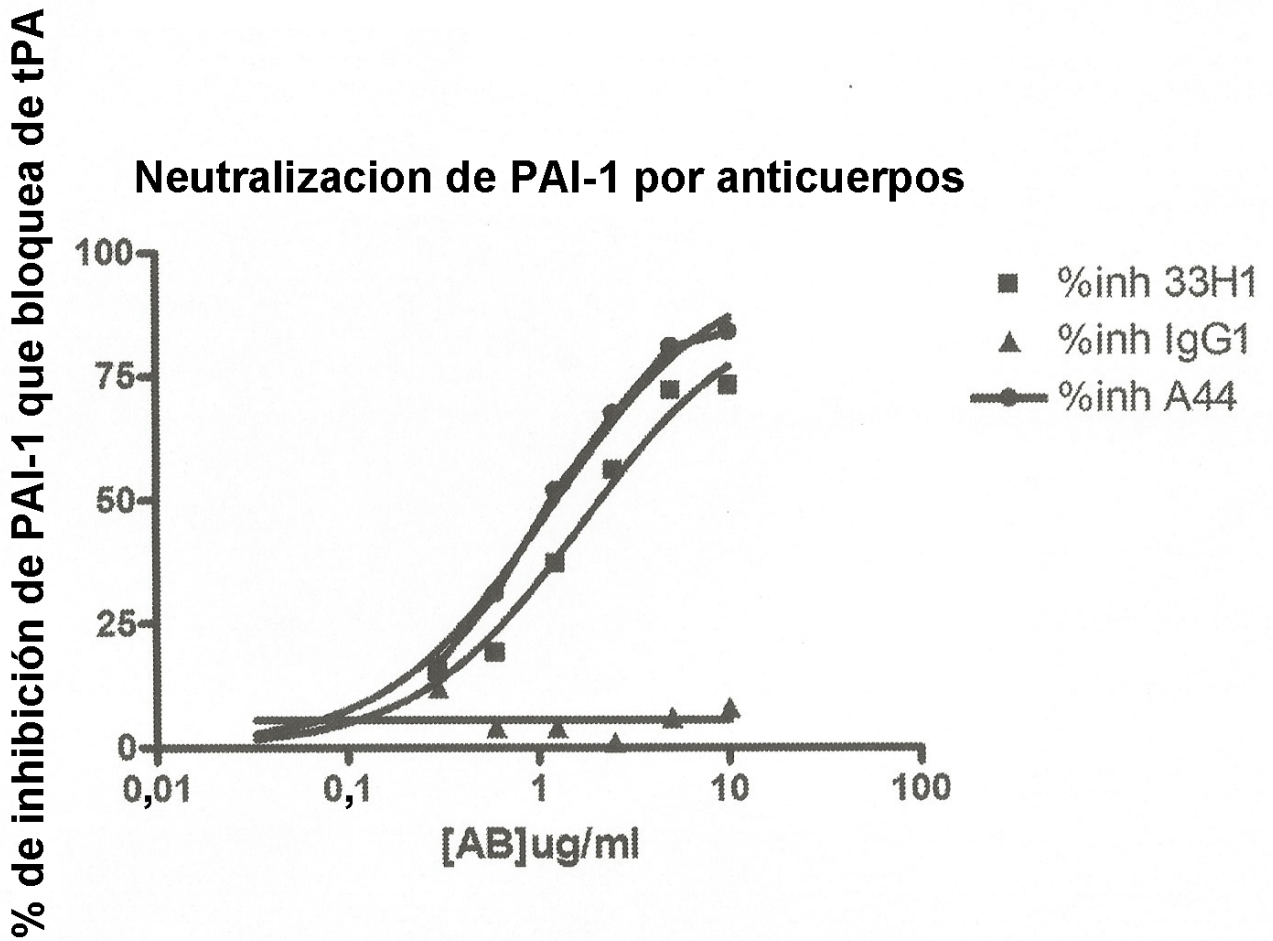
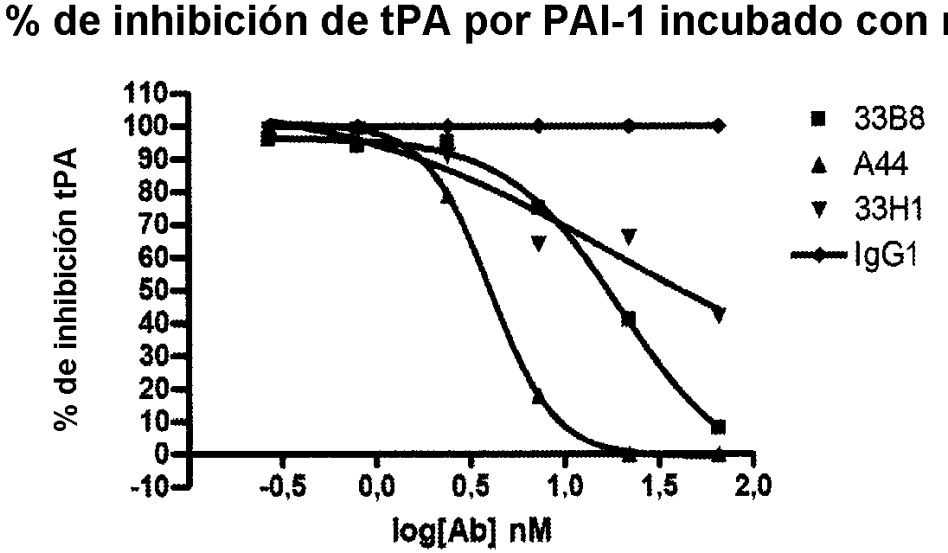
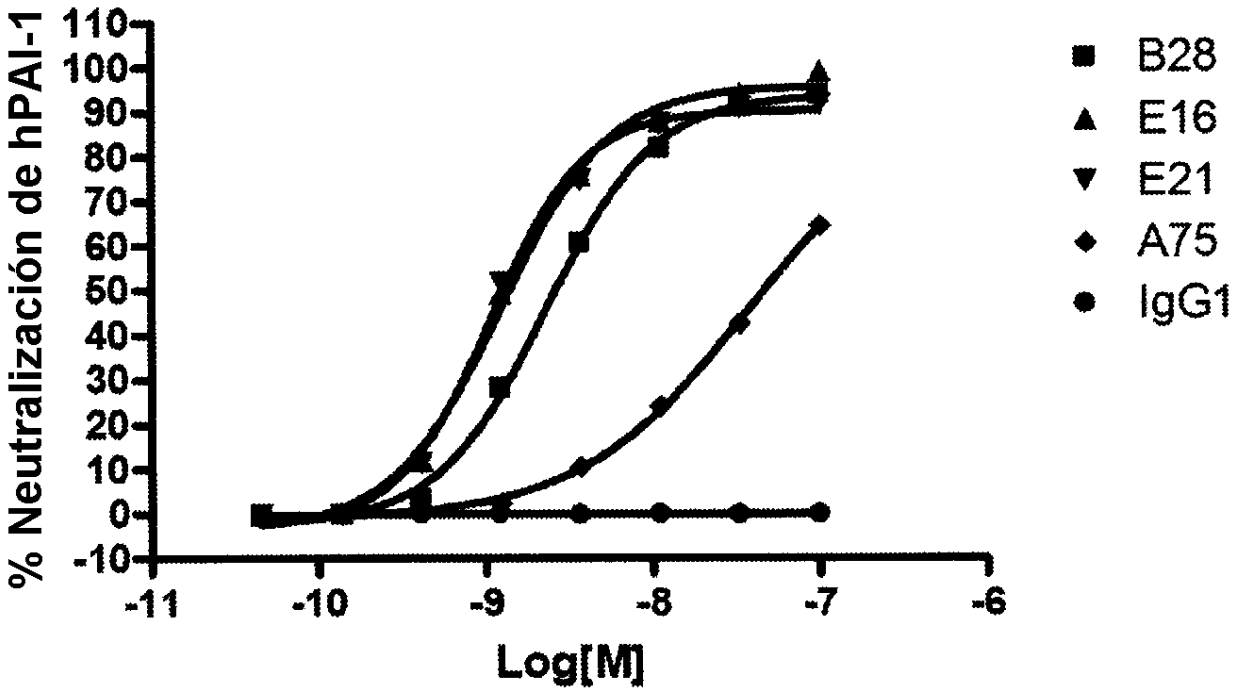

Neutralizacion de PAI-1 por anticuerpos
% de inhibición de PAI-1 que bloquea de tPA
100
75
50
25
0
0,01
0,1
1
10
100
[AB]ug/ml
%inh 33H1
%inh IgG1
%inh A44

FIG. 3



	33B8	A44	33H1
Dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable)			
Valores Best-fit			
SUPERIOR	-7,036	-0,6570	14,38
INFERIOR	96,59	100,8	108,9
LOGCE50	1,292	0,6048	1,249
HILLSLOPE	-1,449	-2,526	-0,5931
CE50	19,58	4,026	17,76

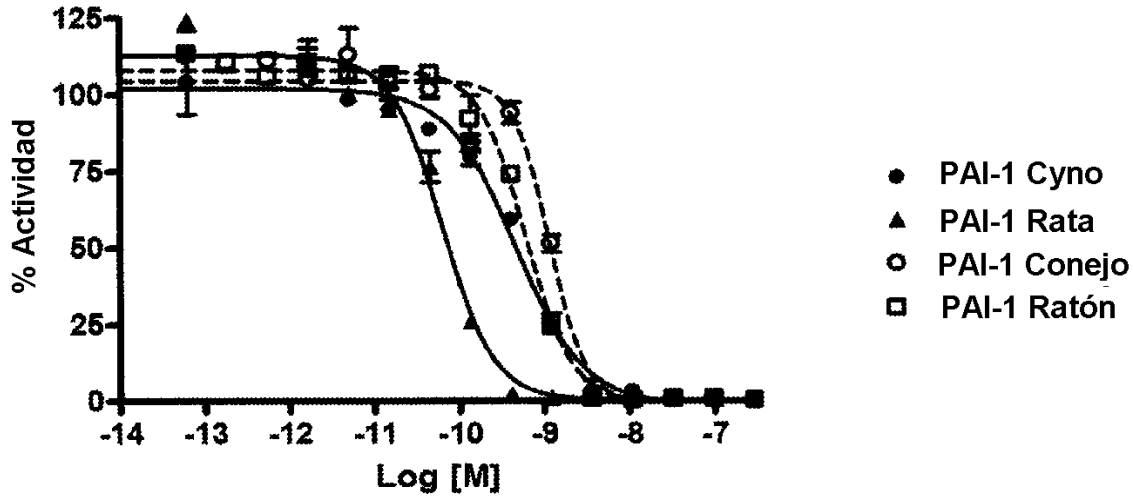
FIG. 4



	B28	E16	E21	A75
HILLSLOPE	1,336	1,338	1,555	0,8527
CE50	2,302e-009	1,237e-009	1,081e-009	3,820e-008

FIG. 5

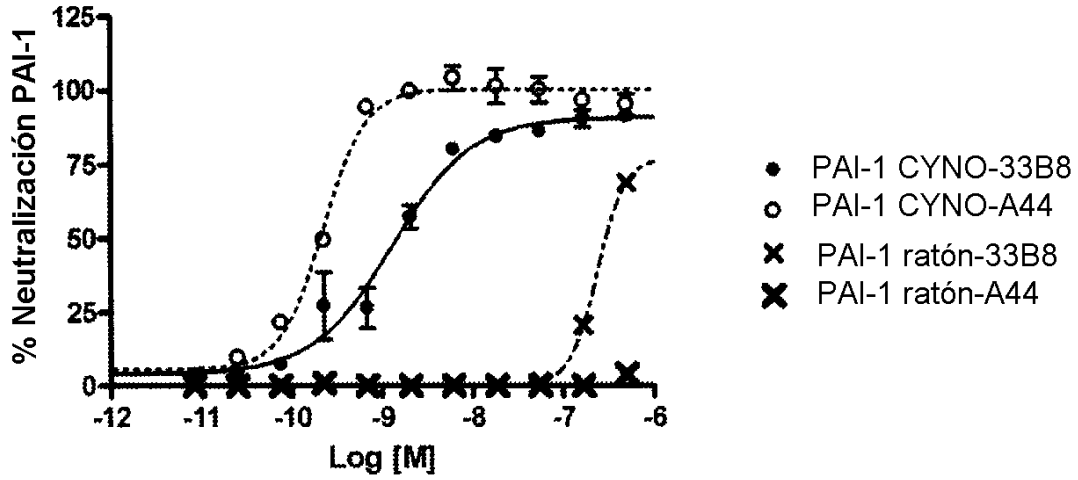
% Actividad tPA 1,4 nM v. PAI-1 de Ratón, Cyno, Rata, y Conejo



	PAI-1 Cyno	PAI-1 Rata	PAI-1 Conejo	PAI-1 Ratón
HILLSLOPE	-1,087	-1,461	-2,079	-1,606
CE50	4,632e-010	6,425e-011	1,169e-009	6,143e-010

FIG. 6

% Neutralizacion de PAI-1 de Cyno 2,8 nM y de Ratón 2,8 nM v. Mab IMA-33B8 y A44



	PAI-1-CYNO 33B8	PAI-1-CYNO-44A	PAI-1 ratón-33B8
HILLSLOPE	0,9877	1,841	2,831
CE50	1,303e-009	2,255e-010	2,395e-007

FIG. 7

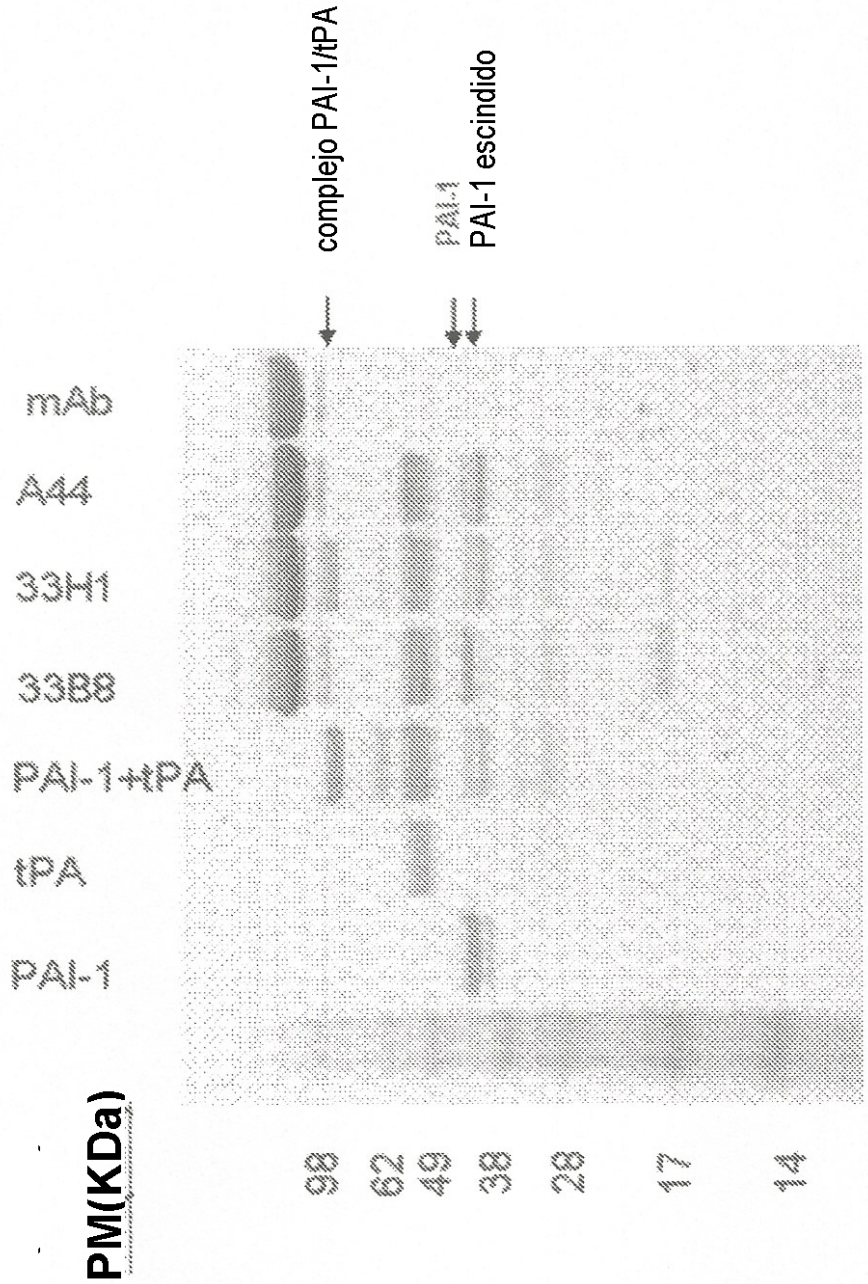

complejo PAI-1/tPA
PAI-1
PAI-1 escindido
mAb
A44
33H1
33B8
PAI-1+tPA
tPA
PAI-1
PM(KDa)
68
62
49
38
28
17
14

FIG. 8

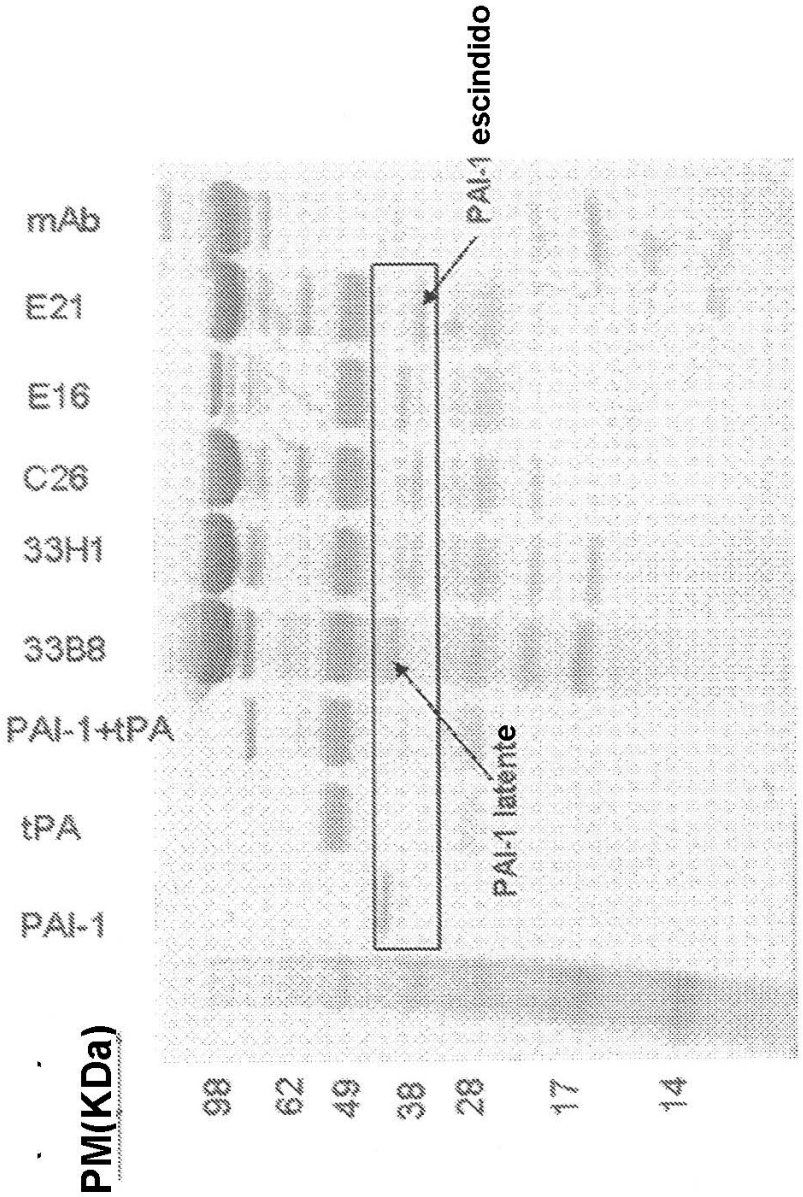

mAb
E21
E16
C26
33H1
33B8
PAI-1+tPA
tPA
PAI-1
PM(KDa)
98
62
49
38
28
17
14
PAI-1 escindido
PAI-1 latente

FIG. 9

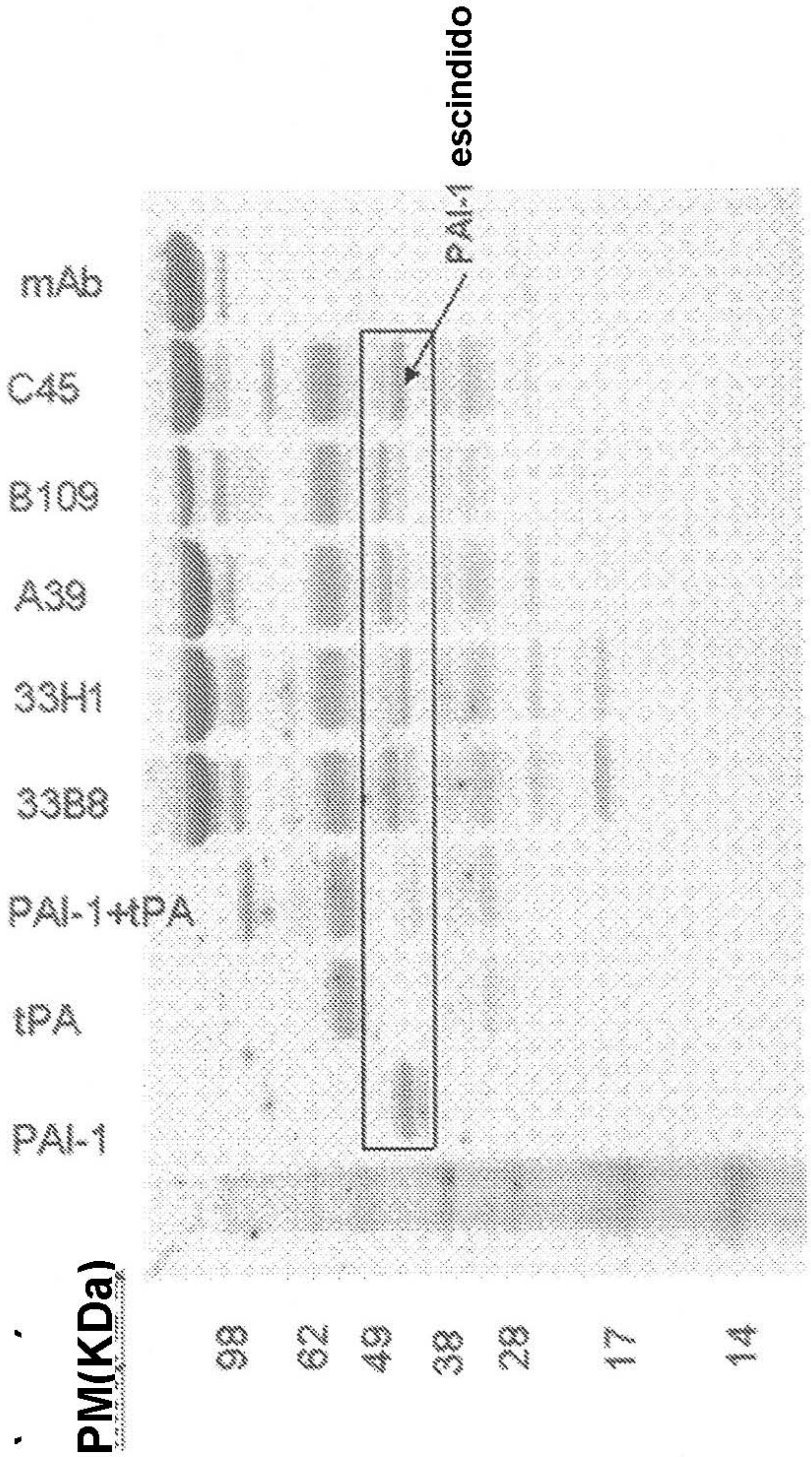

PAI-1 escindido
mAb
C45
B109
A39
33H1
33B8
PAI-1+tPA
tPA
PAI-1
PM(KDa)
98
62
49
38
28
17
14

FIG. 10

ALINEAMIENTO VL

```
A105: DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPQRLISLVSK
A39:  DIQMTHSPASLSASVGETVTITCRASENIY-----SYLAWYHQKQGKSPQLLVYNAKT
A44:  DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWLQQKPGKSPKTLIYRANR
A71:  DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLYWLLQRPGQSPKRLIYLVSK
A75:  DVVMTQTPLTLSVTIGQPASI-CKSSQSLLDSEGKTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVCK
B109: DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSIPCKASQDVS-----SAVAWYQQKLGQSPKLLIYSASF
B28:  DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVY-----SYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKT
C45:  DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
E16:  DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVS-----TAVGWYQQEPGQSPKLLIYSASN
E21:  DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS-----NYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR

A105: LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLSRVEGADLGVYYCWQDRHFPRTFGGGTKLEIKRAD
A39:  LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNIKSLQPEDFGTFYCQHRYGSPWTFGGGTKLEIKRAD
A44:  SVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPPTFGGGTKLEIKRAD
A71:  LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPRTFGGGTKLEIKRAD
A75:  LDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEGEDLGVYYCWQGSHFPQTFGGGTKLEIKRAD
B109: RYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPYTFGGGTNLEIKRAD
B28:  LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLQPEDFGSYYCQHHYGTPPTFGGGTKVEIKRAD
C45:  LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRTFGGGTKLEIK---
E16:  RHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPWTFGGGTKLEIK---
E21:  LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK----
```

FIG. 11

ALINEAMIENTO VH

```
A105: QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSIYWIEWVKQRPGL------------------GLEWIGEILPGSGST
A39:  QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQWVKQRPGH----------------GLEWIGEILPGSN-T
A44:  EMQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSMTNGYWNWIRKFPGN----------------KLEYMGYIT-YSGST
A71:  QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQRPGH----------------GLDWIGEILPGSGNT
A75:  QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIAWLKQRPGH----------------GLEWIAEILPGSGLT
B109: EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDT
B28:  QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQRPGL------------------GLEWIGKILPGSGGA
C45:  QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPGQ----------------GLEWIGVIHPGSGVT
E16:  EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQTPEK----------------GLGWVASLRTGGN-T
E21:  EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQ----------------GLEWIGWIDPENGDT

A105: NYNEKFKGKATFTADTSSNTAFMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYDLDYWGQGTILTVSSAKTTPP
A39:  NYNEKFKDKATFTADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGI-GLRGALDYWGQGTSVTVSSAKTTPP
A44:  YYNPSLKGRISITRNTSKNQYYLQLSSVTTEDTATYYCARWHY-GSPYYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP
A71:  NYNEKFKGKATFTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYNLDSWGQGTTLTVSSAKTTPP
A75:  NYNEIFRGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARG---GLYYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAP
B109: TYNQKFEDKAKLTAVASASTAYMEVSSLTNEDSAVYYCTRG--LRRWGAMDYWGQGTSVTVSSAKTTPP
B28:  NYNEKFKGKATVTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARLST-GTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP
C45:  NYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGTSVTVSS------
E16:  YYSDSVKGRFTISRDNDRNILYLQMSSLTSEDTAVYYCARG--LRHWGYFDVWGAGTTVTVSS------
E21:  EYDPKFQAKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCMYG---NYPYYFDYWGQGTTLTVSS------
```

FIG. 12

Alineamiento de LC de A44 con vk1:

```
A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
VK1: DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA
A44: ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG
VK1: ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDLATYYCQQ SYSTPPTFGQ
A44: GTKLEIK
VK1: GTKVEIK
```

Alineamiento de LC de A44 con vlambda3:

```
A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITXKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
VL3: -SYELTQPPS VSVSPGQTAS ITXSGDKLGD KYASWYQQKP GQSPVLVIYQ
A44: ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYXLQ YDEFPPTFGG
VL3: DSKRPSGIPE RFSGSNSGNT ATLTISGTQA MDEADYYXQA WDSSAVVFGG
A44: GTKLEIK
VL3: GTKLTVL
```

FIG. 13

Alineamiento de HC de A44 con vh2:

```
A44: EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVTGDSMT --NGYWNWIR KFPGNKLEYM
VH2: QVTLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGVGVGWIR QPPGKALEWL
A44: GYITYSGSTY YNPSLKGRIS ITRNTSKNQY YLQLSSVTTE DTATYYCARW
VH2: ARIDWDDDKY YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARM
A44: HYGSPYYFDY WGQGTTLTVSS
VH2: GFTG-TYFDY WGQGTLVTVSS
```

Alineamiento de HC de A44 con vh4:

```
A44: EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TXSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGNKLEYMGY
VH4: QVQLQESGPG LVKPSETLSL TXTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
A44: ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL QLSSVTTEDT ATYYXARWHY
VH4: IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYXARGDS
A44: GSPYYFDYWG QGTTLTVSS
VH4: SG-YYFDYWG QGTLVTVSS
```

FIG. 14

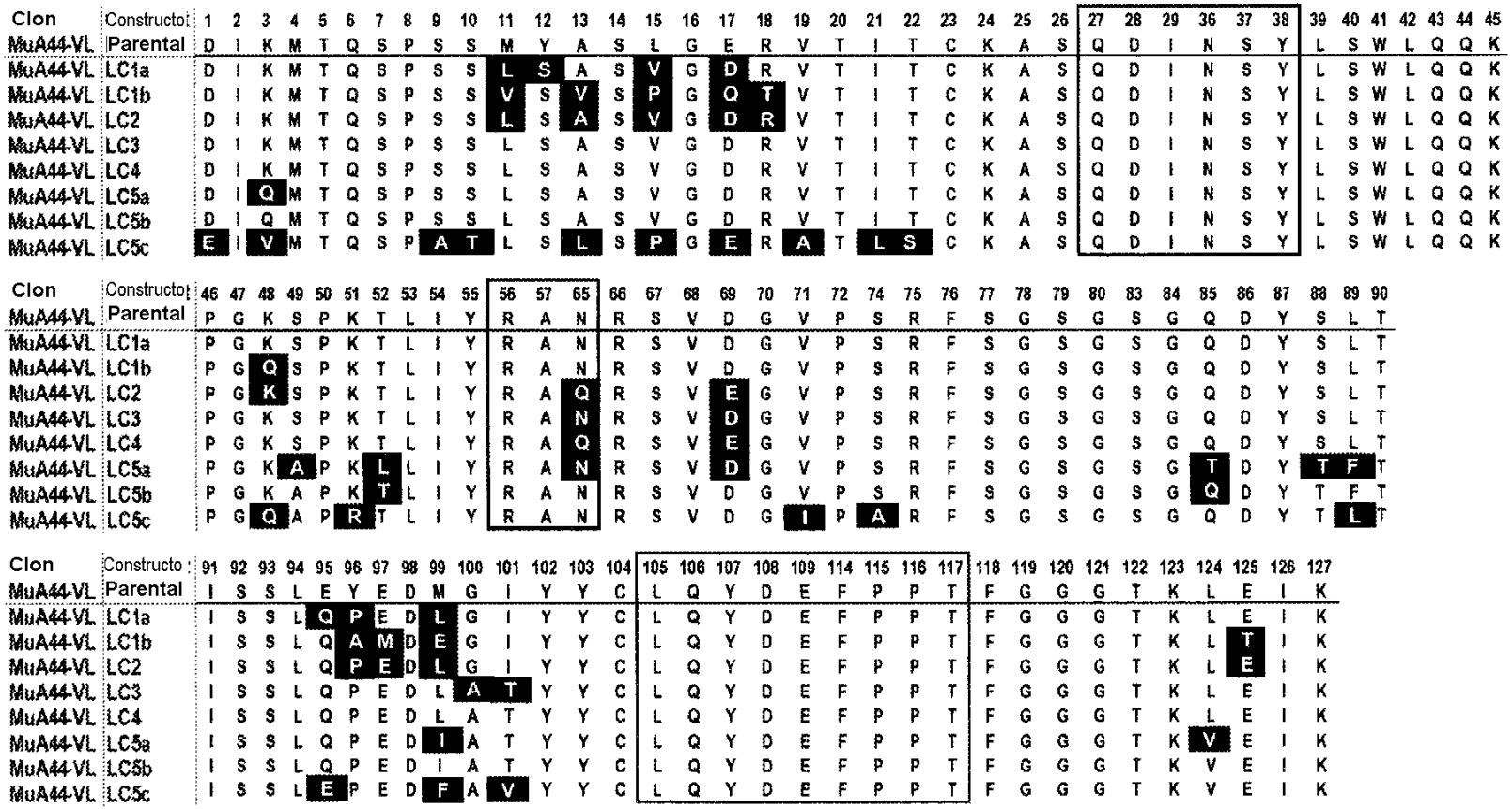

Clon
Constructo:
MuA44-VL
Parental
MuA44-VL LC1a
MuA44-VL LC1b
MuA44-VL LC2
MuA44-VL LC3
MuA44-VL LC4
MuA44-VL LC5a
MuA44-VL LC5b
MuA44-VL LC5c

FIG. 15

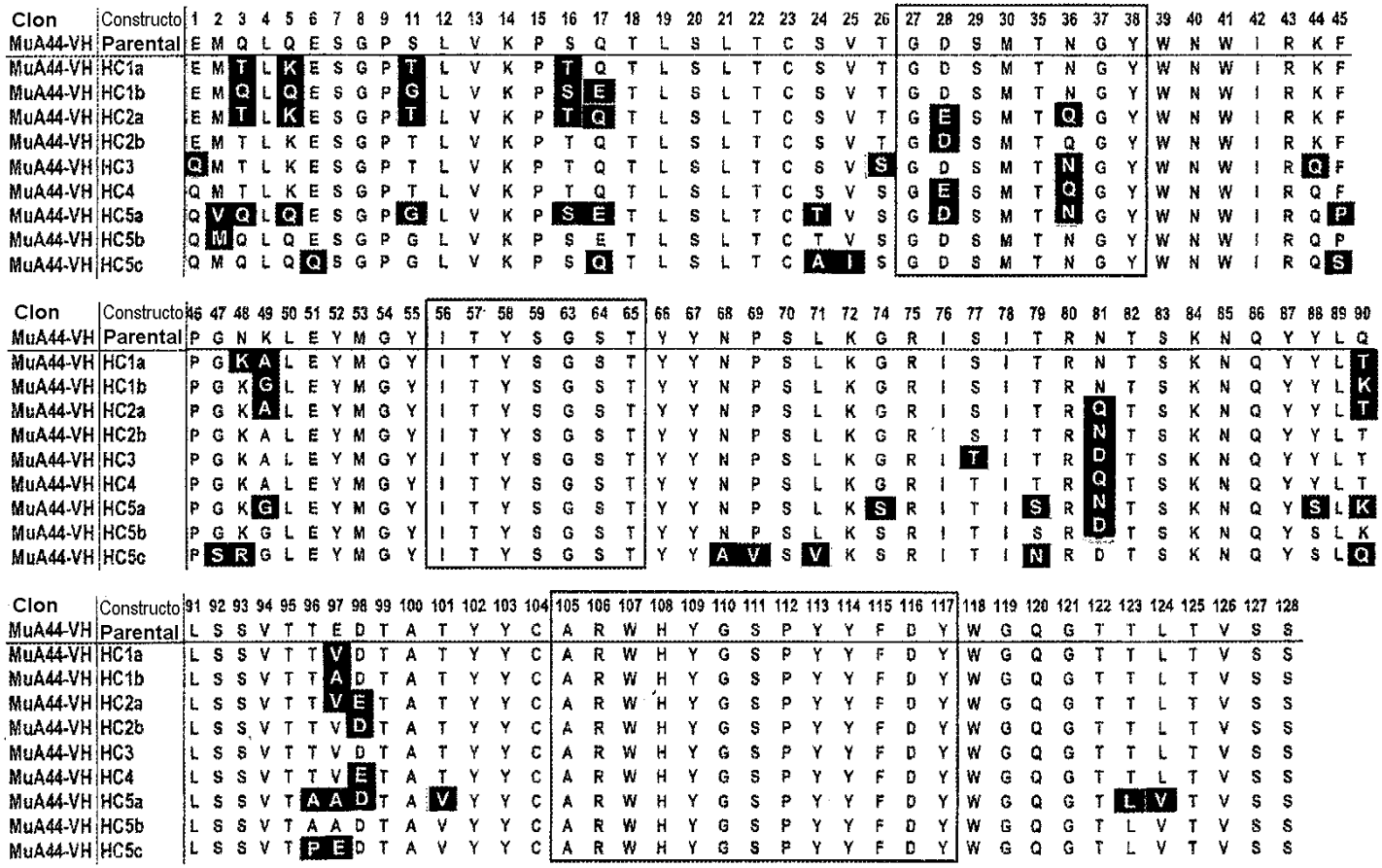

Clon
Constructo
MuA44-VH
Parental
MuA44-VH HC1a
MuA44-VH HC1b
MuA44-VH HC2a
MuA44-VH HC2b
MuA44-VH HC3
MuA44-VH HC4
MuA44-VH HC5a
MuA44-VH HC5b
MuA44-VH HC5c

FIG. 16

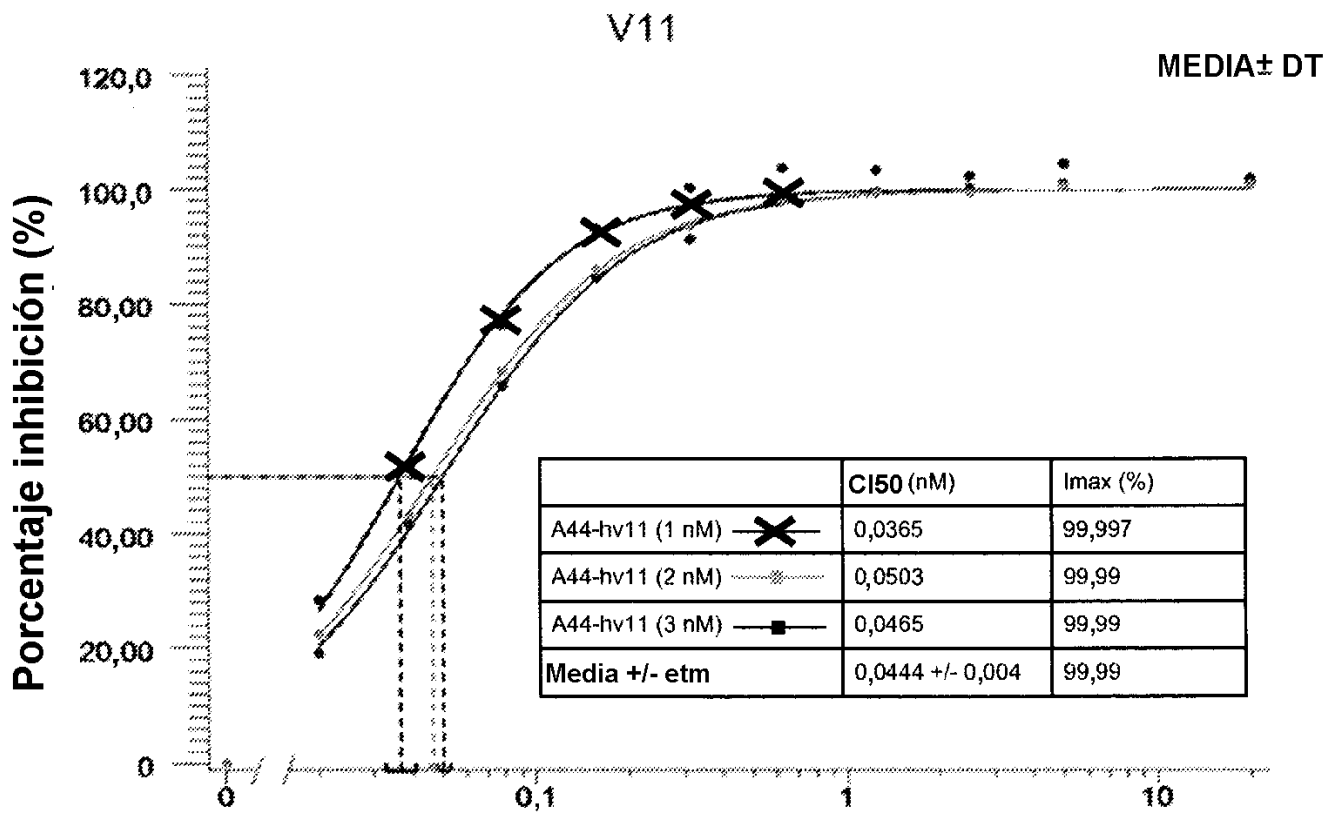

V11
MEDIA± DT
Porcentaje inhibición (%)
120,0
100,0
80,00
60,00
40,00
20,00
0
0
0,1
1
10
CI50 (nM)
Imax (%)
A44-hv11 (1 nM)
0,0365
99,997
A44-hv11 (2 nM)
0,0503
99,99
A44-hv11 (3 nM)
0,0465
99,99
Media +/- etm
0,0444 +/- 0,004
99,99

FIG. 17

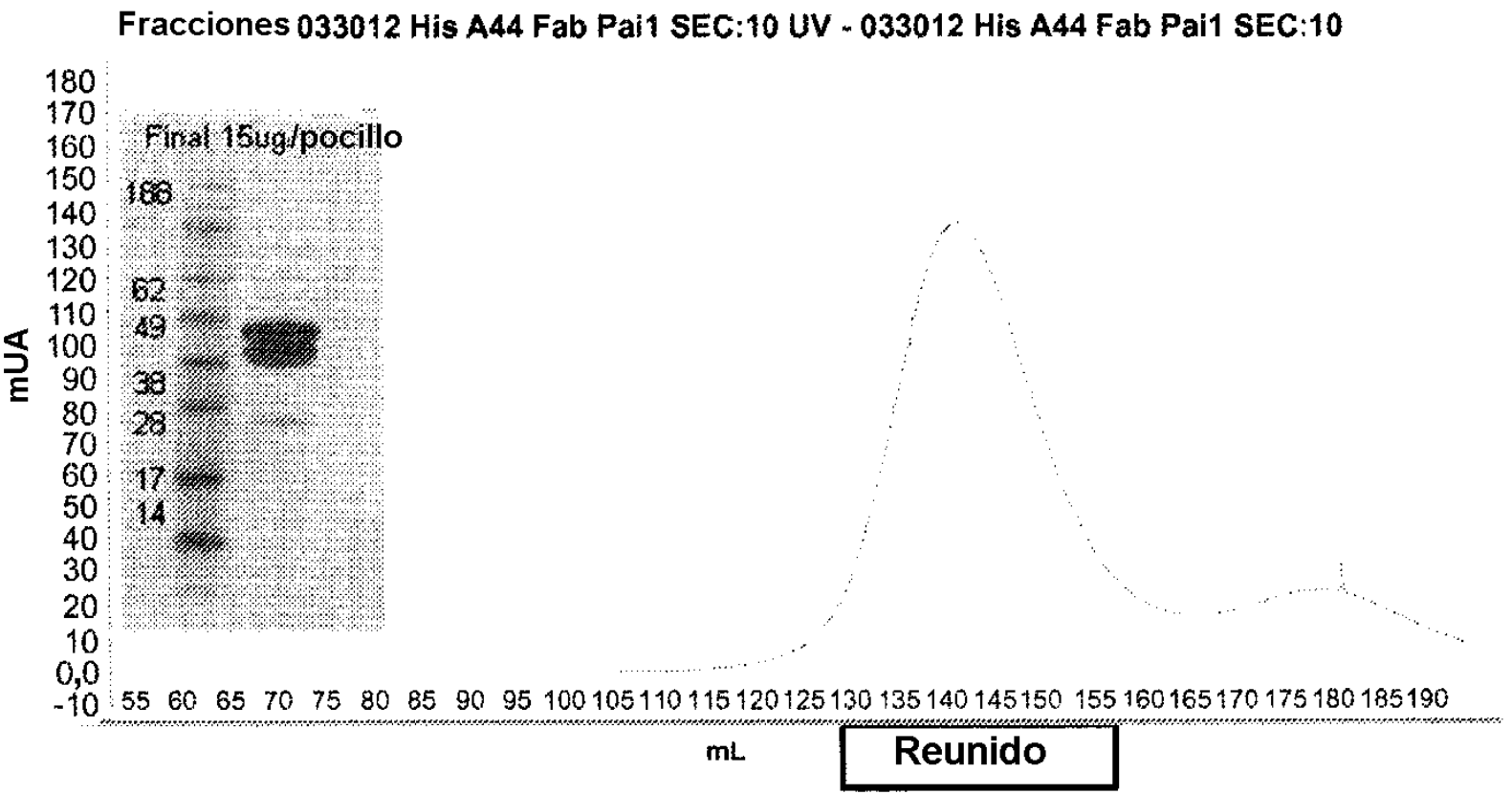

Fracciones 033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10 UV - 033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10
Final 15ug/pocillo
186
62
49
38
28
17
14
mUA
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0,0
-10
55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190
mL
Reunido

FIG. 18

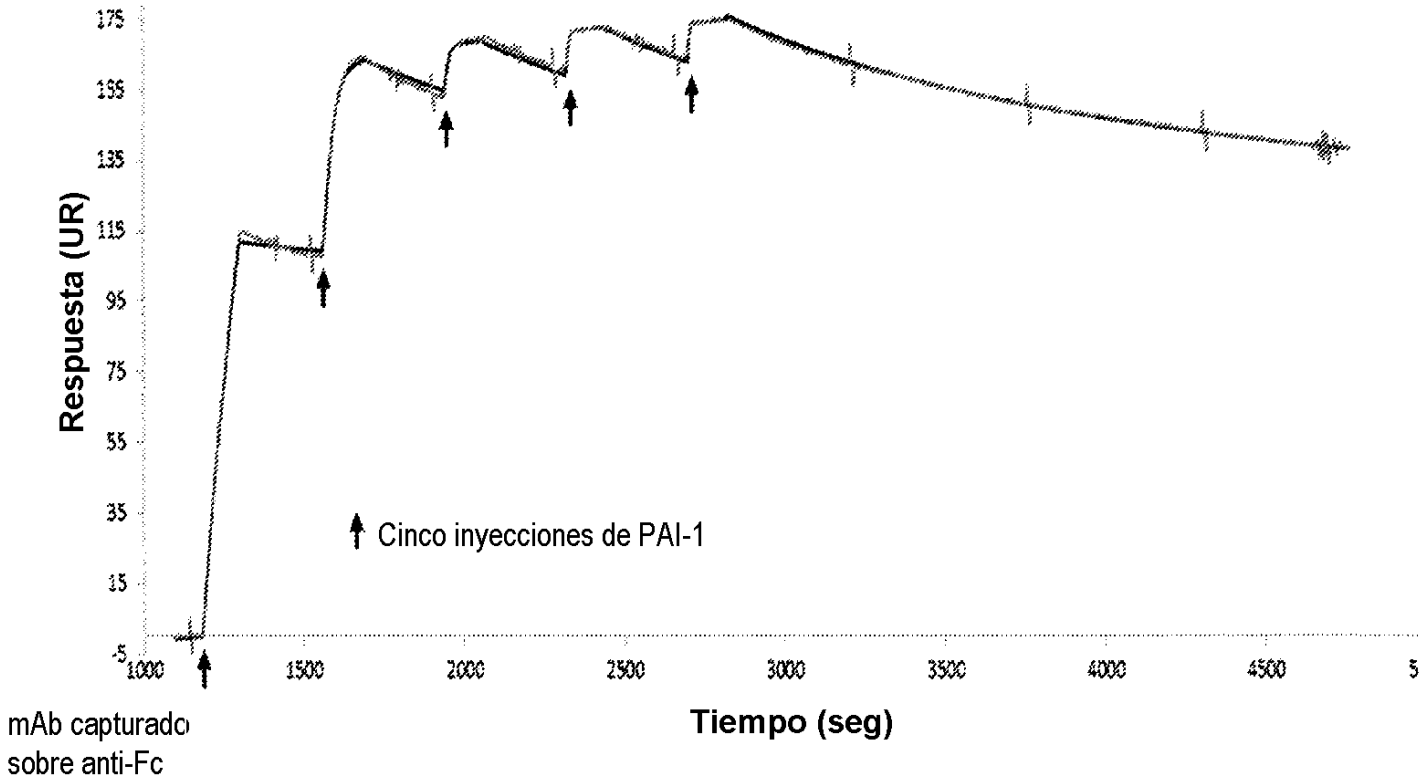

Respuesta (UR)
175
155
135
115
95
75
55
35
15
-5
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5
Cinco inyecciones de PAI-1
Tiempo (seg)
mAb capturado
sobre anti-Fc

FIG. 19

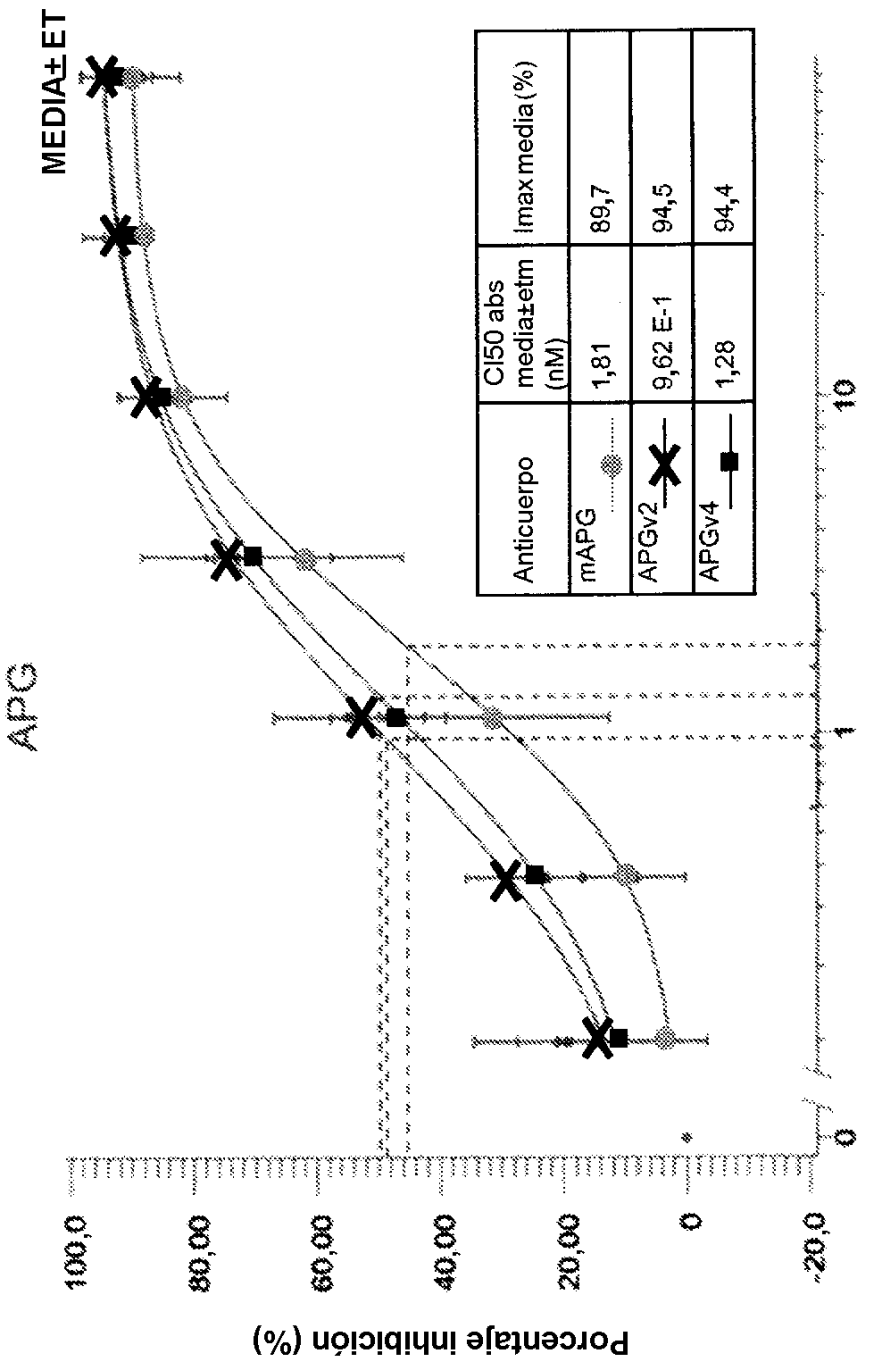

APG
MEDIA± ET
Porcentaje inhibición (%)
100,0
80,00
60,00
40,00
20,00
0
-20,0
0
1
10
Anticuerpo
CI50 abs media±etm (nM)
Imax media (%)
mAPG
1,81
89,7
APGv2
9,62 E-1
94,5
APGv4
1,28
94,4

FIG. 20

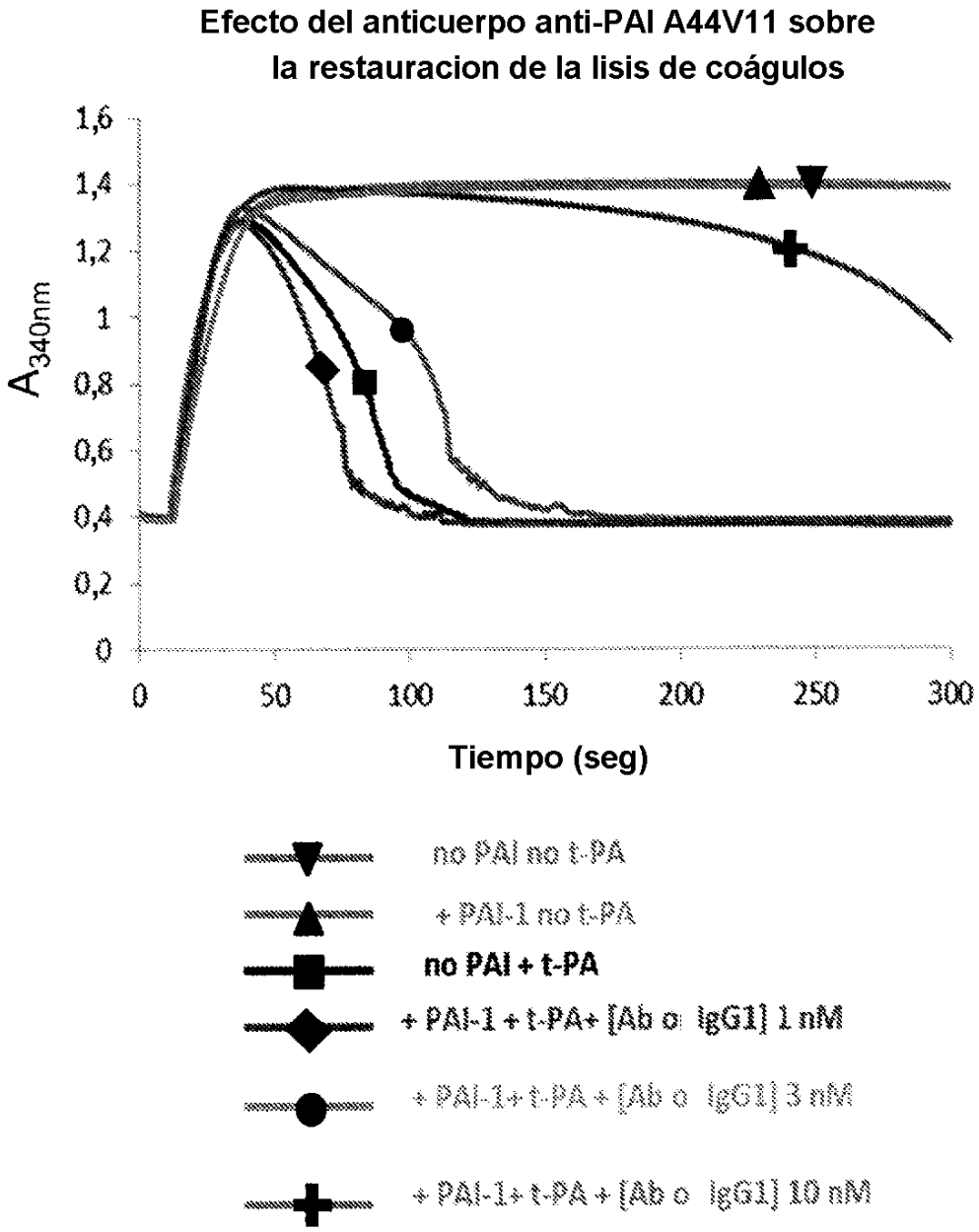

Efecto del anticuerpo anti-PAI A44V11 sobre
la restauracion de la lisis de coágulos
A340nm
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
50
100
150
200
250
300
Tiempo (seg)
no PAI no t-PA
+ PAI-1 no t-PA
no PAI + t-PA
+ PAI-1 + t-PA+ [Ab o IgG1] 1 nM
+ PAI-1+ t-PA + [Ab o IgG1] 3 nM
+ PAI-1+ t-PA + [Ab o IgG1] 10 nM

FIG. 21

Efecto del isotipo IgG1 sobre la restauracion de la lisis de coágulos

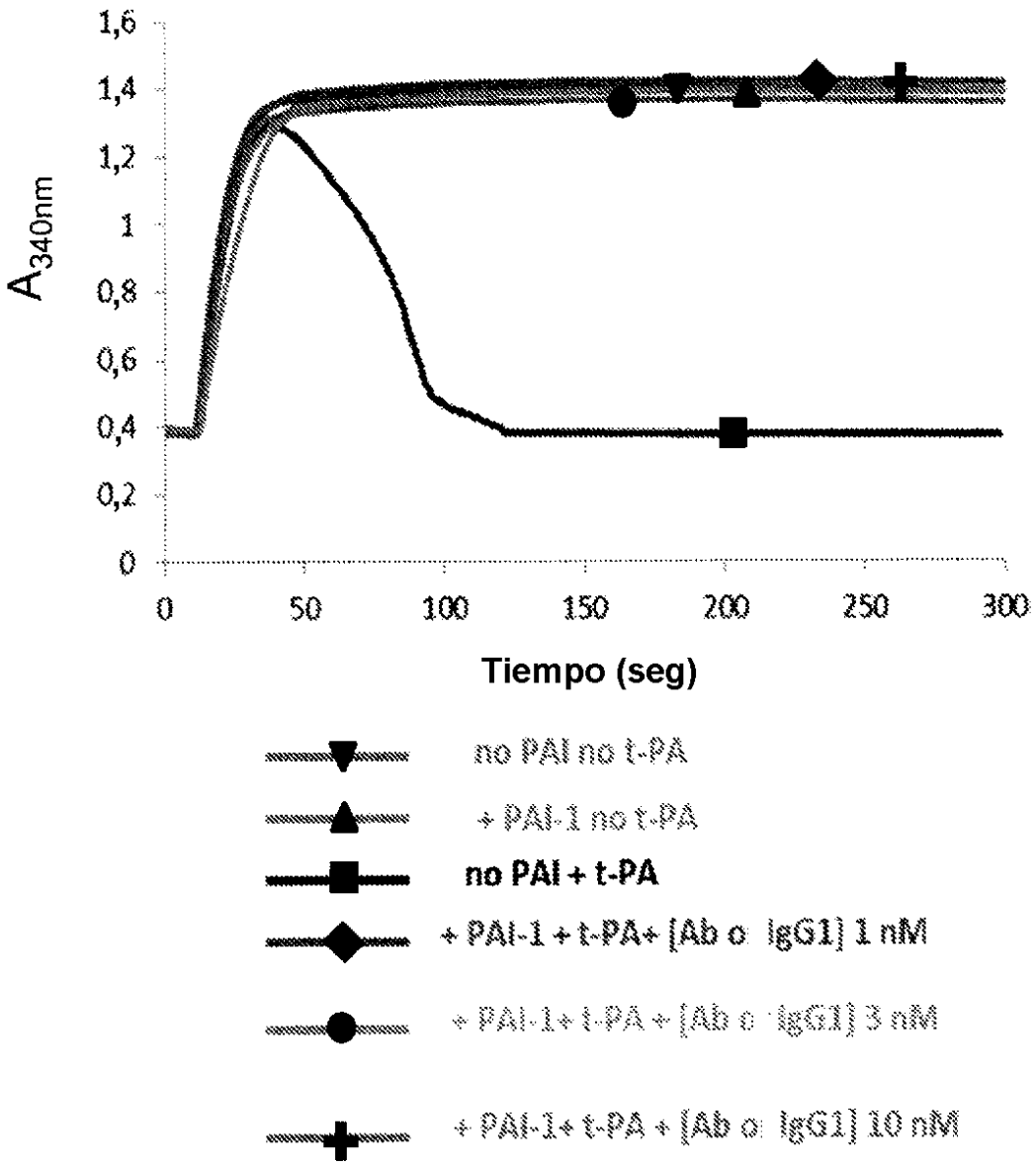


FIG. 22

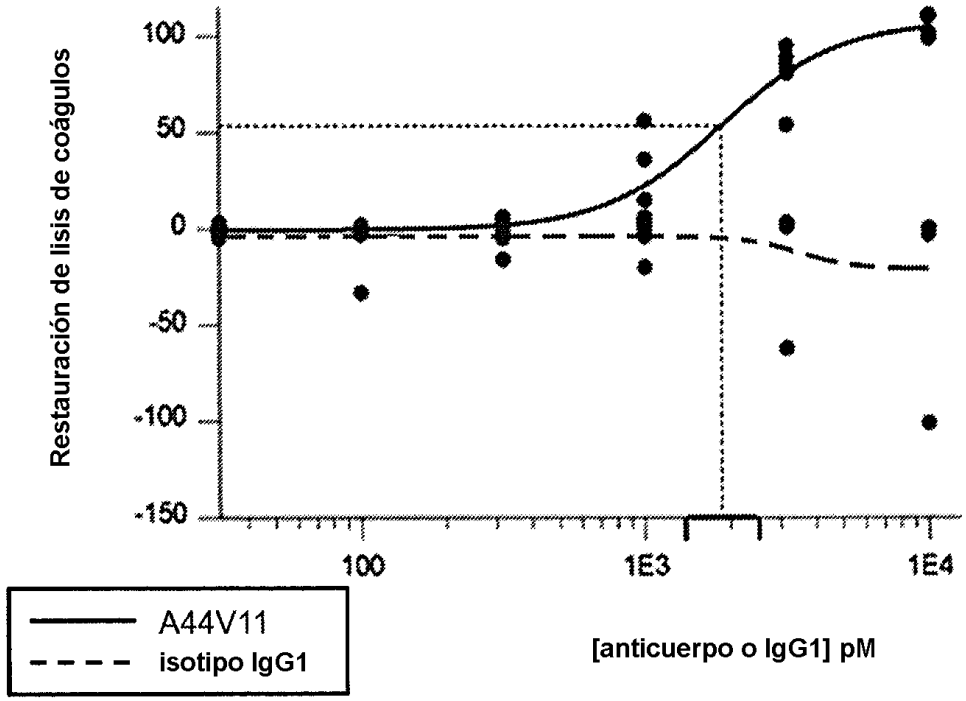

Restauración de lisis de coágulos
100
50
0
-50
-100
-150
100
1E3
1E4
A44V11
isotipo IgG1
[anticuerpo o IgG1] pM

FIG. 23

Efecto del anticuerpo anti-PAI APG nativo y humanizado sobre la restauración de la lisis de coágulos

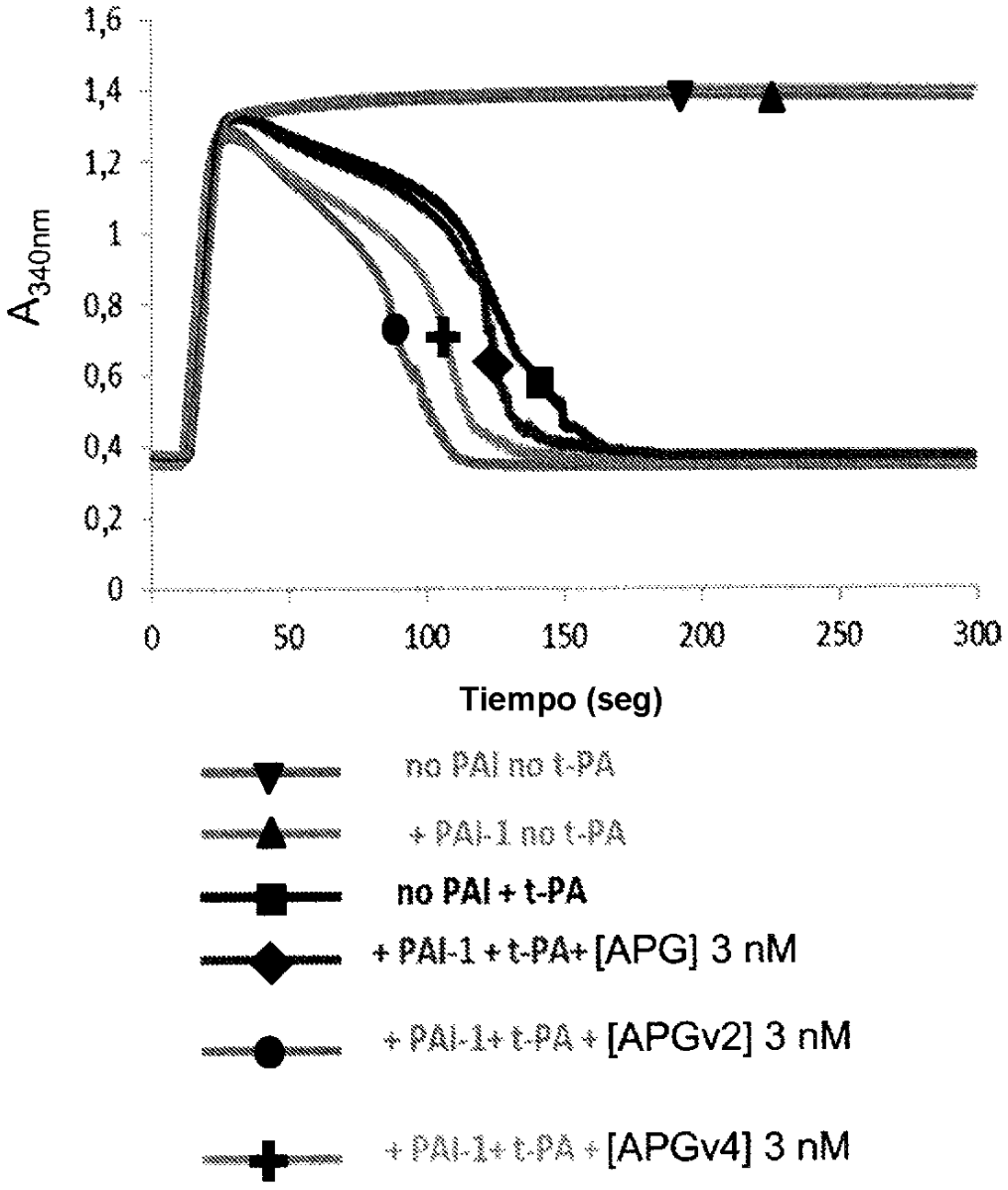


FIG. 24

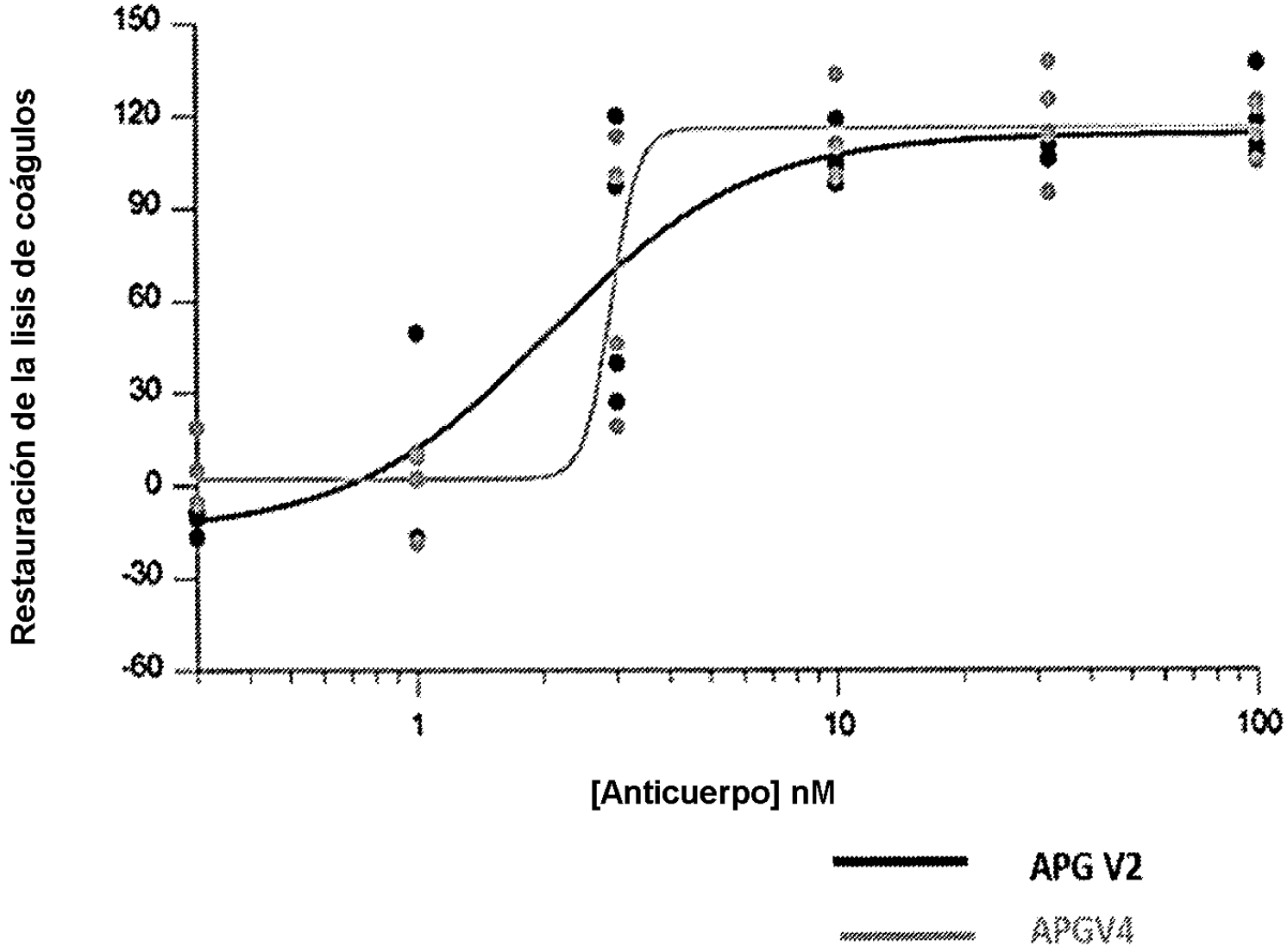

Restauración de la lisis de coágulos
150
120
90
60
30
0
-30
-60
1
10
100
[Anticuerpo] nM
APG V2
APGV4

FIG. 25



FIG. 26

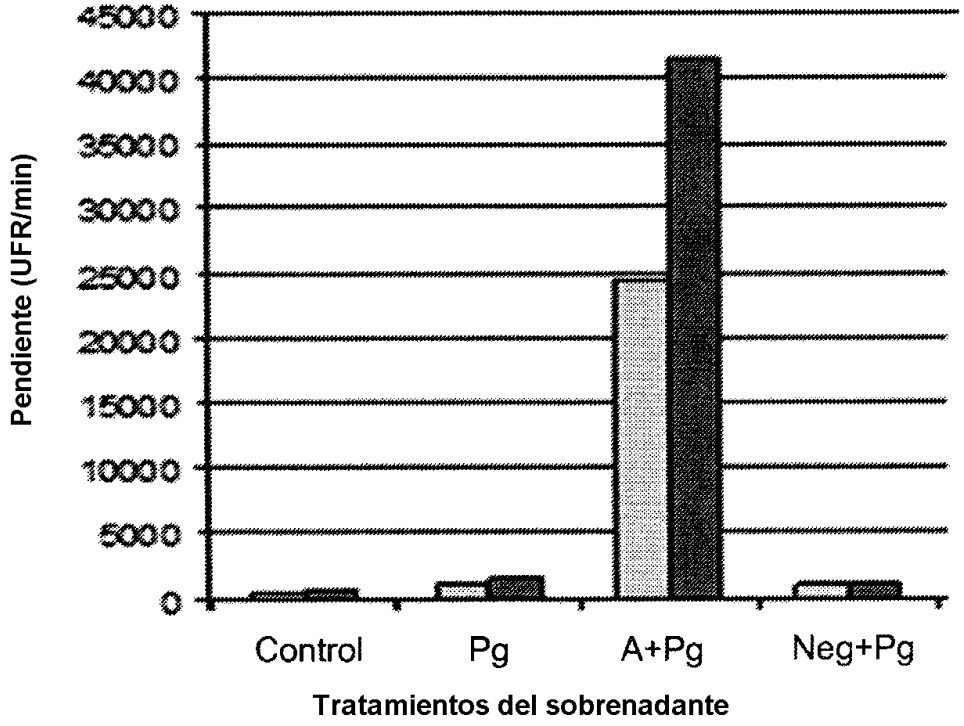

45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Pendiente (UFR/min)
Control
Pg
A+Pg
Neg+Pg
Tratamientos del sobrenadante

FIG. 27

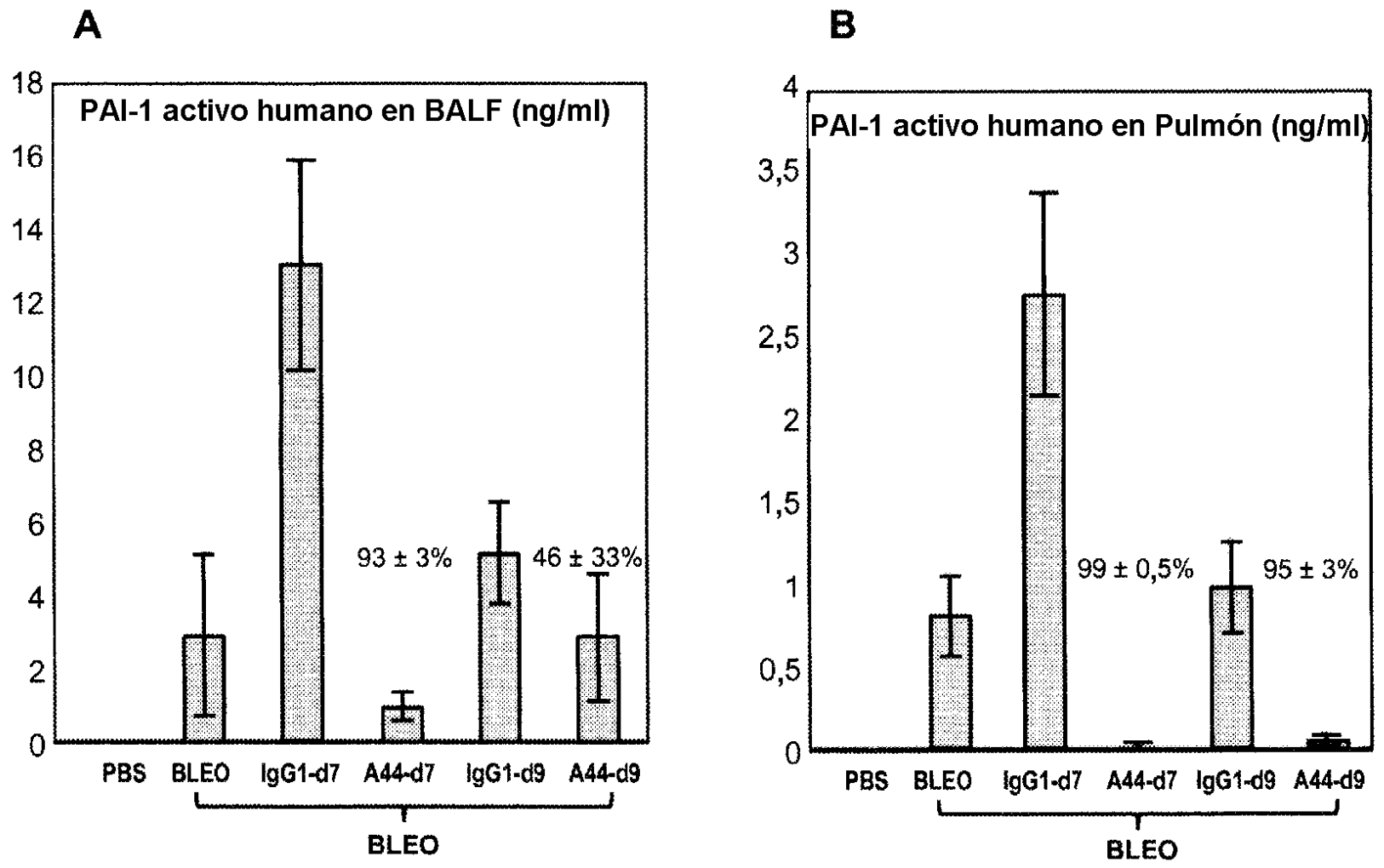

A
PAI-1 activo humano en BALF (ng/ml)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
93 ± 3%
46 ± 33%
PBS
BLEO
IgG1-d7
A44-d7
IgG1-d9
A44-d9
BLEO
B
PAI-1 activo humano en Pulmón (ng/ml)
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
99 ± 0,5%
95 ± 3%
PBS
BLEO
IgG1-d7
A44-d7
IgG1-d9
A44-d9
BLEO

FIG. 28

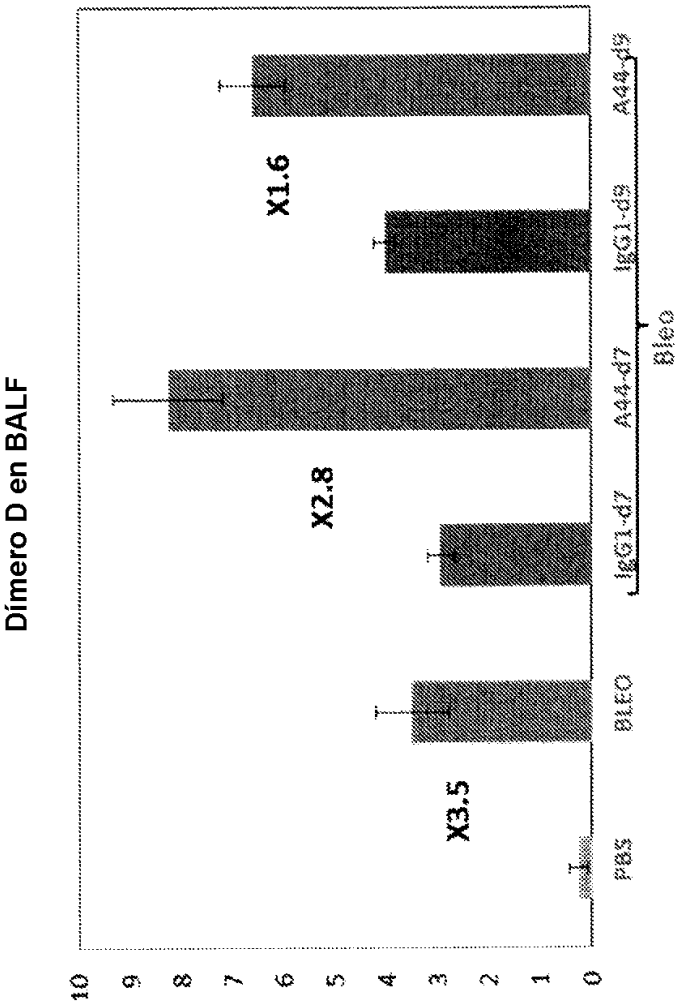
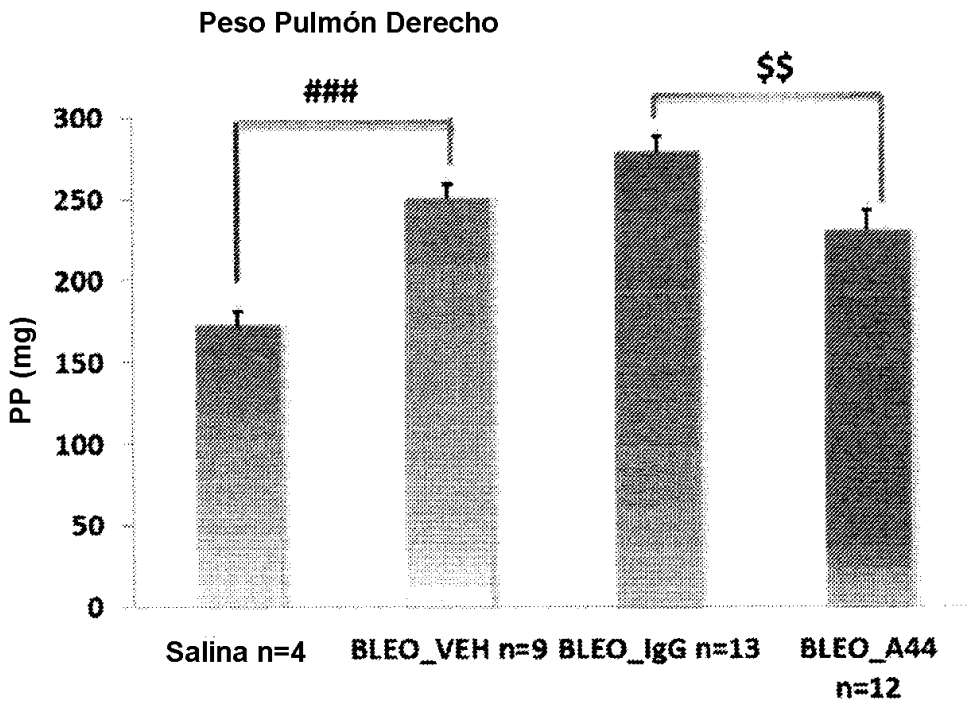

Dimero D en BALF
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
X3.5
X2.8
X1.6
PBS
BLEO
IgG1-d7
A44-d7
IgG1-d3
A44-d3
Bleo

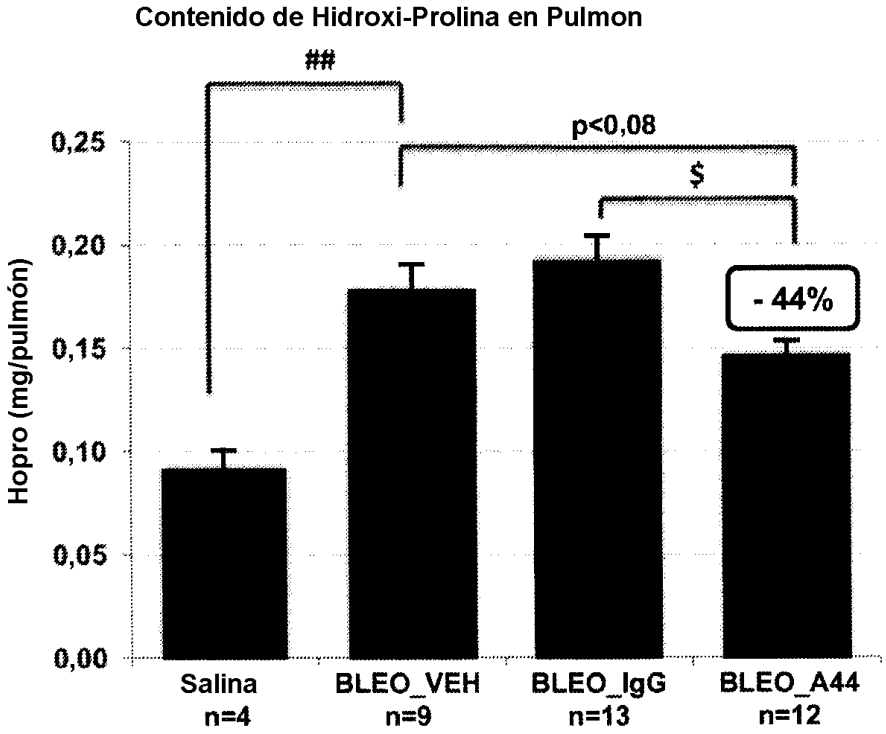
FIG. 29



Anova una vía seguido de prueba de Newman-Keuls

: p<0,001 vs PBS $$: p<0,01 vs BLEO_IgG1

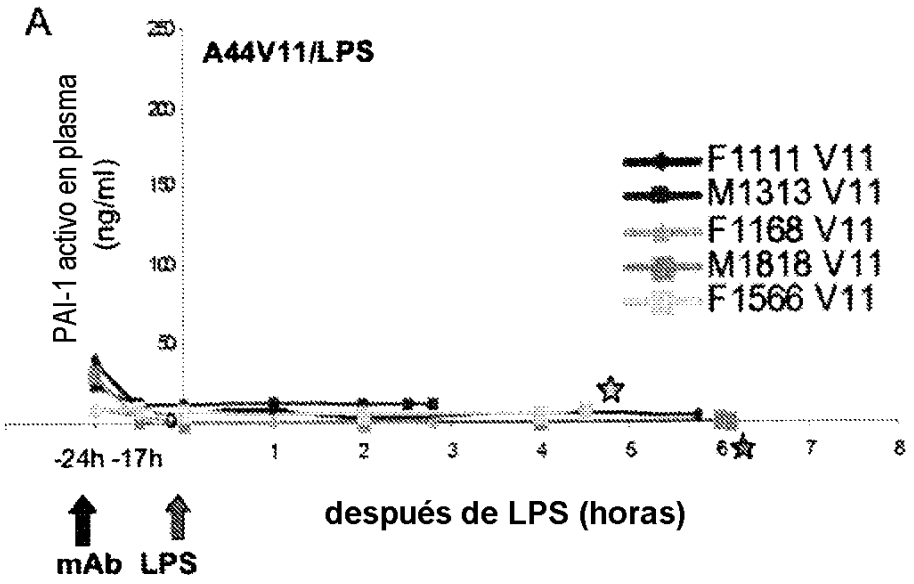
FIG. 30



ANOVA de una vía seguido de prueba de Newman-Keuls.

: p<0,01 vs PBS $: p<0,05 vs BLEO_IgG1

FIG. 31


A
A44V11/LPS
PAI-1 activo en plasma (ng/ml)
F1111 V11
M1313 V11
F1168 V11
M1818 V11
F1566 V11
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
8
mAb
LPS
después de LPS (horas)

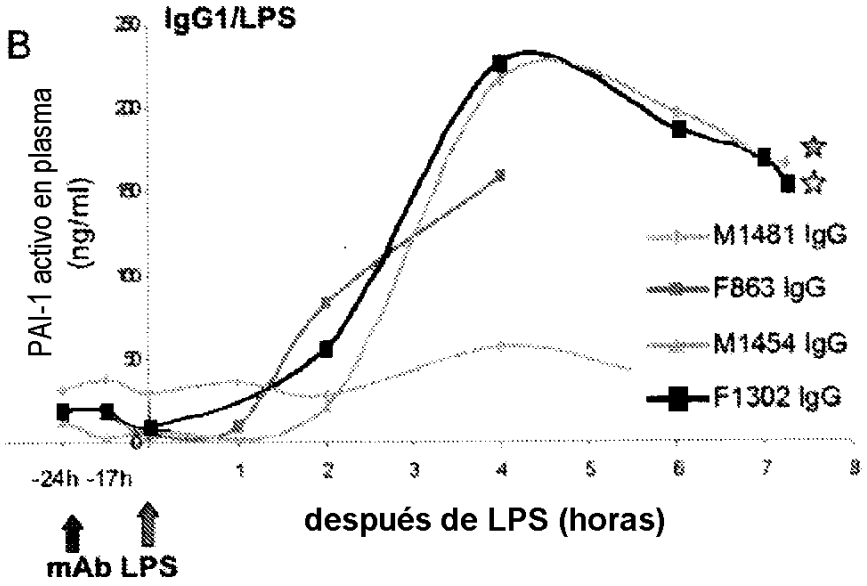

B
IgG1/LPS
PAI-1 activo en plasma (ng/ml)
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
8
mAb LPS
después de LPS (horas)

FIG. 32

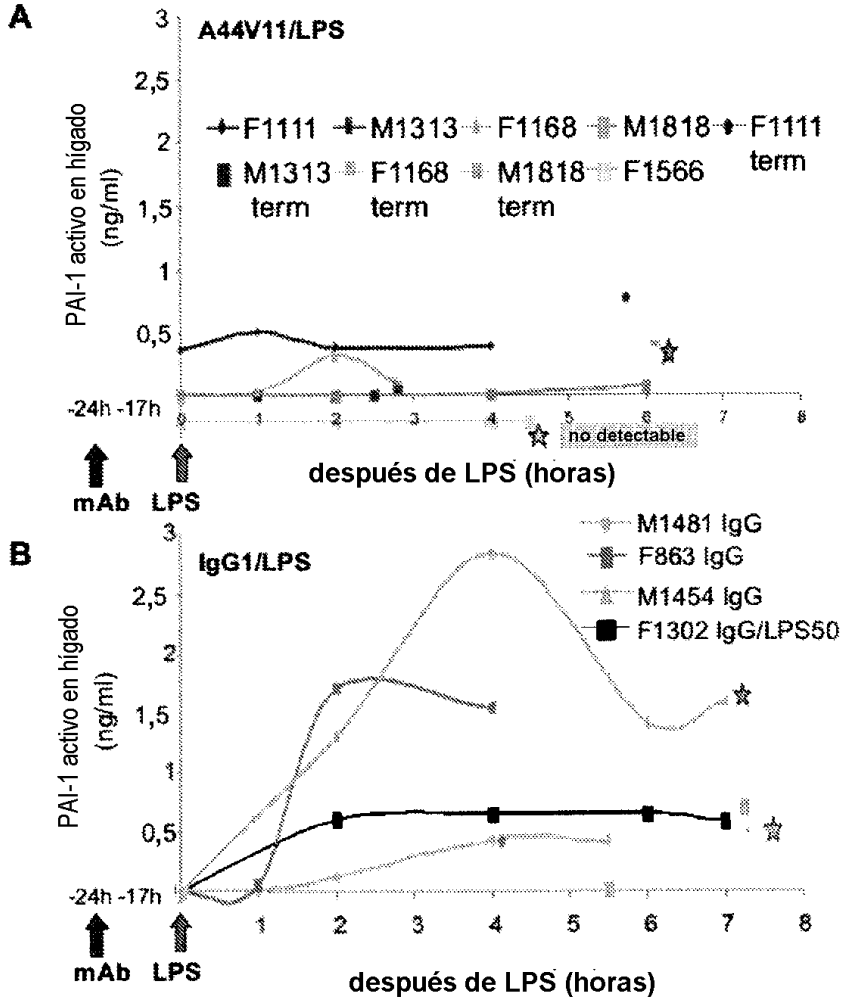

A
A44V11/LPS
PAI-1 activo en hígado (ng/ml)
F1111
M1313
F1168
M1818
F1111 term
M1313 term
F1168 term
M1818 term
F1566
no detectable
-24h -17h
mAb
LPS
después de LPS (horas)
B
IgG1/LPS
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG/LPS50
PAI-1 activo en hígado (ng/ml)
-24h -17h
mAb
LPS
después de LPS (horas)

FIG. 33

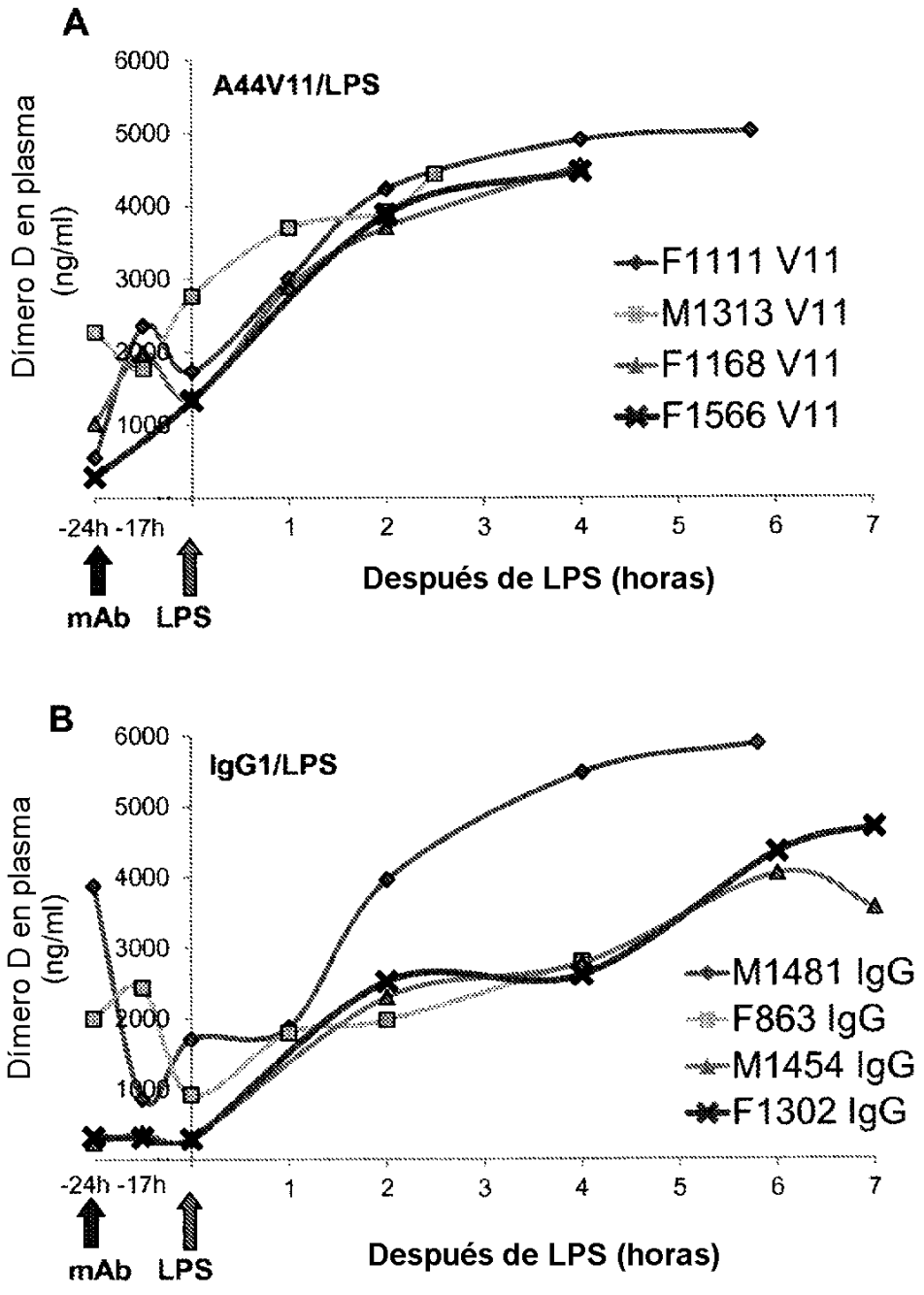

A
A44V11/LPS
Dímero D en plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
F1111 V11
M1313 V11
F1168 V11
F1566 V11
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
mAb
LPS
Después de LPS (horas)
B
IgG1/LPS
Dímero D en plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
mAb
LPS
Después de LPS (horas)

FIG. 34

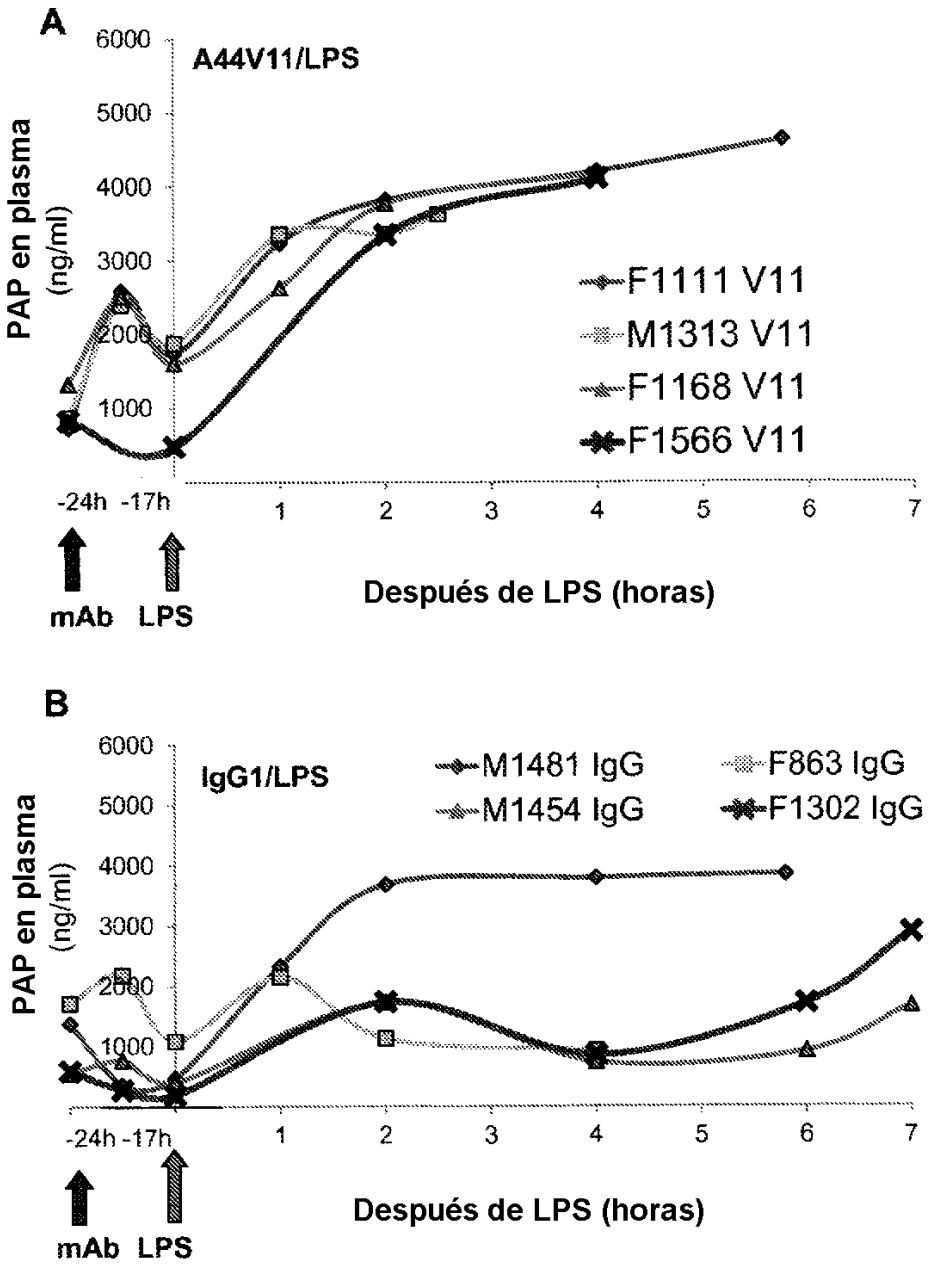

A
A44V11/LPS
PAP en plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
F1111 V11
M1313 V11
F1168 V11
F1566 V11
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
mAb
LPS
Después de LPS (horas)
B
IgG1/LPS
M1481 IgG
F863 IgG
M1454 IgG
F1302 IgG
PAP en plasma (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
-24h -17h
1
2
3
4
5
6
7
mAb
LPS
Después de LPS (horas)

FIG. 35

A
U/ml PAI-1
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
6 horas-isotipo
6 horas-A44
72 horas-isotipo
72 horas A44
Dia 7-isotipo
Dia 7-A44
*
B
ng PAI-1 / mg proteína
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
6 horas-isotipo
6 horas-A44
72 horas-isotipo
72 horas A44
Dia 7-isotipo
Dia 7-A44

FIG. 36

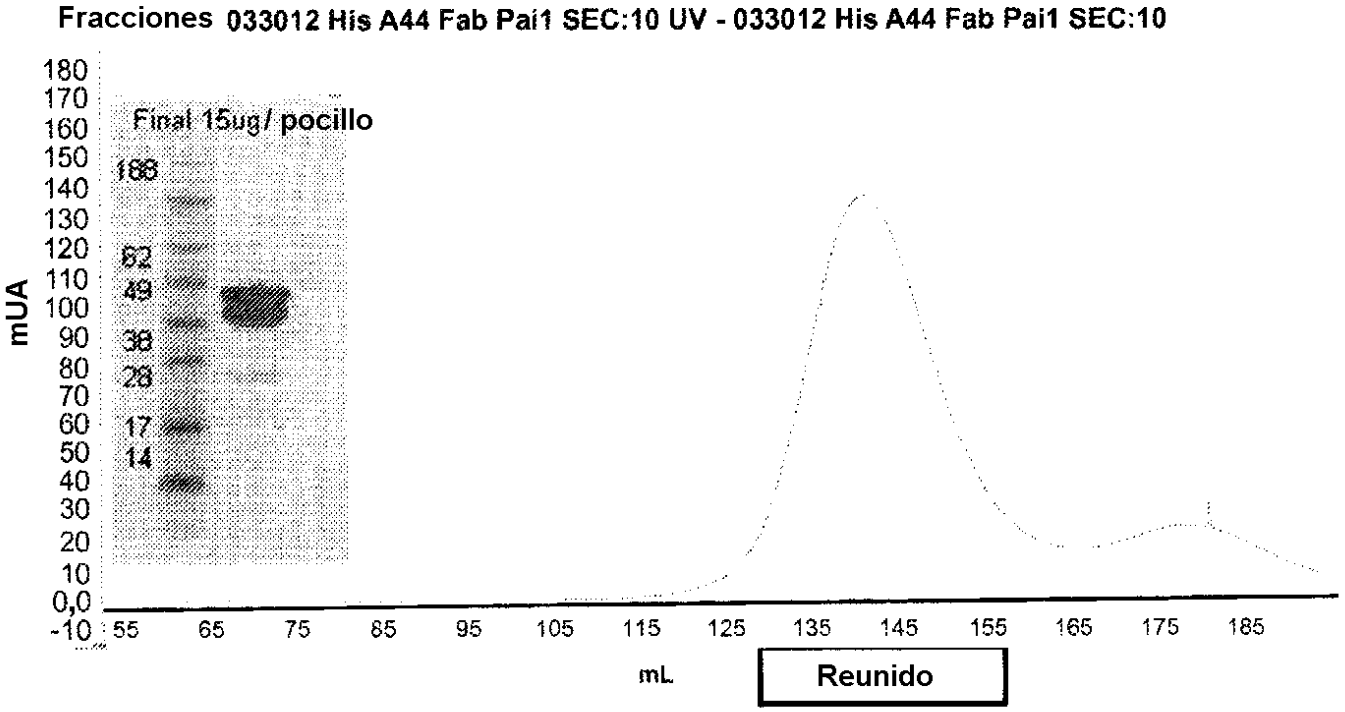

Fracciones 033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10 UV - 033012 His A44 Fab Pai1 SEC:10
Final 15ug/ pocillo
186
62
49
38
28
17
14
mUA
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0,0
-10
55
65
75
85
95
105
115
125
135
145
155
165
175
185
mL
Reunido

FIG. 37

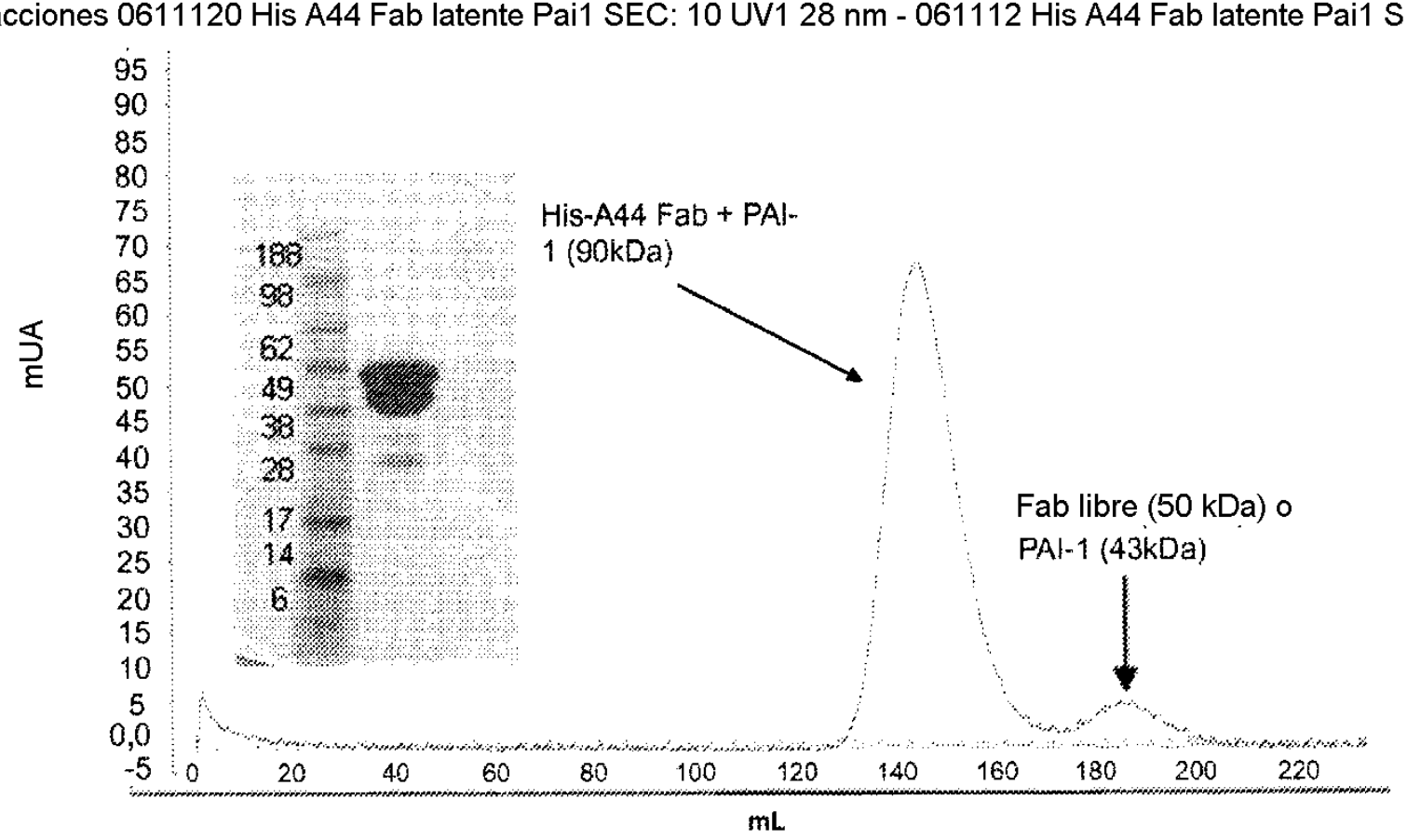
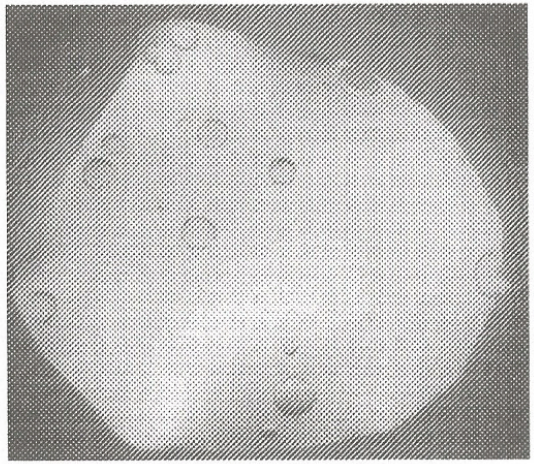

Fracciones 0611120 His A44 Fab latente Pai1 SEC: 10 UV1 28 nm - 061112 His A44 Fab latente Pai1 SEC : 1-
mUA
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0,0
-5
188
98
62
49
38
28
17
14
6
His-A44 Fab + PAI-1 (90kDa)
Fab libre (50 kDa) o PAI-1 (43kDa)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
mL

FIG. 38

A



B

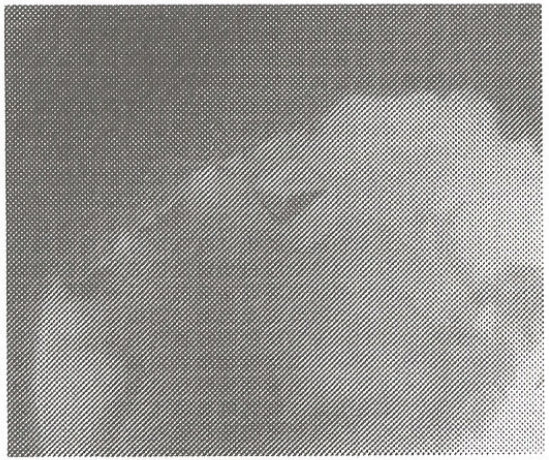


FIG. 39

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv))
for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Bruno Poirier

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Cyril Daveu

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Francis Duffieux

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: 2014/09/11
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Alla Pritsker

Residence: 142 Bramble Dr., Morganville, NJ 07751
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, New Jersey 08807 US

Inventor's Signature: Alla Pritsker Date: 09/09/2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Patrick Grailhe

Residence:
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: Date:
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Alexey Rak

Residence:
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: Date:
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Han Li

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 388 Twig Lane, Yardley, Pennsylvania 19067 - US

Inventor's Signature: ..... Date: 9/11/2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Dorothea Kominos

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 99 Rolling Hill Drive, Millington, New Jersey 07946 - US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Philip Janiak

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris FRANCE

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Han Li

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 388 Twig Lane, Yardley, Pennsylvania 19067 - US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Dorothea Kominos

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 99 Rolling Hill Drive, Millington, New Jersey 07946 - US

Inventor's Signature: Dorothea Kominos Date: 9/10/14
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Philip Janiak

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris FRANCE

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Han Li

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 388 Twig Lane, Yardley, Pennsylvania 19067 - US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Dorothea Kominos

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 99 Rolling Hill Drive, Millington, New Jersey 07946 - US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Philip Janiak

Residence: FRANCE
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boétie, F-75008 Paris FRANCE

Inventor's Signature: ..... Date: October 6th, 2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Magali Mathieu

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Christopher Ryan Morgan

Residence: Southborough MA
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, New Jersey 08807, US

Inventor's Signature: ..... Date: 30 Sept 2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Nicolas Baurin

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Alla Pritsker

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, New Jersey 08807 US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Patrick Grailhe

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Alexey Rak

Residence: Vitry, France
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: 09.12.2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Alla Pritsker

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, New Jersey 08807 US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Patrick Grailhe

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: P. G Date: 12/09/2014 (Sept. 12th)
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Alexey Rak

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Magali Mathieu

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Christopher Ryan Morgan

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, New Jersey 08807, US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Nicolas Baurin

Residence: 158 boulevard de la croix rousse 69001 lyon france
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: September 12TH 2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Magali Mathieu

Residence: Choisy le Roi, FRANCE
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: 11 September, 2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Christopher Ryan Morgan

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 55 Corporate Drive, Mail Code: 55A-505A, Bridgewater, New Jersey 08807, US

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Nicolas Baurin

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US2014/050896 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: Bruno Poirier

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: 12th September 2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Cyril Daveu

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: 11 September 2014
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: Francis Duffieux

Residence: .....
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: c/o Sanofi, 54, rue La Boetie, Paris, France 75008

Inventor's Signature: ..... Date: .....
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

COLOMBIA

PODER

El (los)

SANOFI

Domiciliados en
54 rue La Boétie, 75008 PARIS, France

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección para

con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de **patentes** de invención, su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan. Con relación a los derechos anteriormente mencionados o en defensa de estos

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy
en
por

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)
(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

SANOFI

Of
54 rue La Boétie, 75008 PARIS, France

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS** a. attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, obtain the protection for

which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of **patents**, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us; with regard to the above mentioned rights or in defense of the same.

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 20January 2012

in Paris

by
Josiane MERLIER
Director, Patent Administration

(Notary shall execute on the other side)
(Consular legalization or apostille is required)

Je soussigné Me Antoine BAILLY
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de Mme Josiane MERLIER
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits et
actes mentionnés dans le présent document

BAILLY POMMERY CAURO
NOTAIRES ASSOCIÉS
D'UNE SCP
Paris

CASTELLANOS & Co.

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

COUR D'APPEL DE PARIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *République française*

Le présent acte public

2. a été signé par Me BAILLY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris

6. le 12 AVR. 2012

7. *par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris*

8. sous n° 24508

9. Sceau :

10. Signature :

Jean MARTIN

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, la qualité en laquelle le signataire a agi et l'identité du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"

BAILLY POMMERY CAURO

Notaires

Successeurs de Maîtres BAILLY et BUCAILLE

30, rue La Boétie – 75008 PARIS
☎ 01.53.53.53.00 - Fax 01.53.53.53.01

Dossier suivi par M. Michaël FREDIER
Tel direct : 01 53 53 53 00 / Fax :01 53 53 53 01
Mail : mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

Expediente seguido por D. Michaël FREDIER
Tel. directo: 01 53 53 53 00/Fax: 01 53 53 53 01
Mail: mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

CERTIFICAT NOTARIAL

Je soussigné, Maître Antoine BAILLY, notaire soussigné de la Société Civile Professionnelle « BAILLY-POMMERY-CAURO » titulaire d'un Office Notarial à Paris (8ème) 30, rue la Boétie.

CERTIFIE ET ATTESTE QUE :

I. *SANOFI est une Société Française immatriculée au Registre du Commerce et des Sociétés de PARIS sous le N° 395 030 844 et dont le siège est sis à Paris (75008), 54 rue La Boétie, que celle-ci est valablement constituée conformément aux lois françaises.*

II. *Mme Josiane MERLIER est bien connue de moi et est la personne ayant signé le document ci-avant.*

III. *Mme Josiane MERLIER dispose en sa qualité de Directeur Administration Brevets, des pouvoirs de représentation suffisants et est dûment qualifiée pour signer et représenter la Société SANOFI pour l'objet du document ci-avant.*

Fait à PARIS,
Le 11 avril 2012

CERTIFICADO NOTARIAL

El abajo firmante, don Antoine BAILLY, Notario miembro de la Sociedad Civil Profesional «BAILLY-POMMERY-CAURO», titular de la Notaría de París (Distrito 8) sita en 30, rue la Boétie.

CERTIFICO Y DOY FE DE QUE:

I. *SANOFI es una sociedad francesa inscrita en el Registro Mercantil de PARÍS con el N° 395 030 844 y con domicilio social en París (75008), 54 rue La Boétie, y que la misma se encuentra válidamente constituida de conformidad con la legislación francesa;*

II. *Conozco a Dª Josiane MERLIER y es la persona que ha firmado el documento precedente;*

III. *Dª Josiane MERLIER ostenta, en su calidad de Director de Administratión de Patentes, poderes de representación suficientes y está debidamente facultada para firmar y representar a la sociedad SANOFI a los efectos del documento precedente.*

Hecho en PARÍS,
El 11 de abril 2012

BAILLY POMMERY CAURO
NOTAIRES ASSOCIÉS
D'UNE SCP
30, rue La Boétie - Paris-8e

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *République française*

Le présent acte public

2. a été signé par Me BAILLY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris

6. le 12 AVR. 2012

7. *par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris*

8. sous n° 24507

9. Sceau :

10. Signature :

Jean MARTIN

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"

LISTADO DE SECUENCIAS REVISADO EN INGLES
SEQUENCE LISTING

<110> Sanofi

<120> ANTIBODIES TO PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1) AND USES THEREOF

<130> 13-596-WO

<140> PCT/US2014/050896
<141> 2014-08-13

<160> 170

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala His Leu Ala Ser Asp Phe Gly
1 5 10 15

Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val
20 25 30

Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser Val Leu Ala Met Leu Gln Leu
35 40 45

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Gln Gln Gln Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe
50 55 60

Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asp Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala
85 90 95

Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu Val Gln Gly Phe Met Pro His
100 105 110

Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu
115 120 125

Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn Asp Trp Val Lys Thr His Thr
130 135 140

Lys Gly Met Ile Ser Asn Leu Leu Gly Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu
145 150 155 160

```
Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys
                165                 170                 175

Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His Arg Arg Leu Phe His Lys Ser
            180                 185                 190

Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe
        195                 200                 205

Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu
    210                 215                 220

Glu Leu Pro Tyr His Gly Asp Thr Leu Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro
225                 230                 235                 240

Tyr Glu Lys Glu Val Pro Leu Ser Ala Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala
                245                 250                 255

Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu
            260                 265                 270

Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys
        275                 280                 285

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

Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu Pro Leu His Val Ala Gln Ala
305                 310                 315                 320

Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser
                325                 330                 335

Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile
            340                 345                 350

Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Val Arg His Asn Pro Thr Gly
        355                 360                 365

Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met Glu Pro
    370                 375
```

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 VH

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
115 120

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 VL

<400> 3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

Pro Gln Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Ala Asp
        115
```

<210> 4
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA39 VH

<400> 4

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

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

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

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

Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met
65                  70                  75                  80

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

Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
        115                 120                 125
```

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA39 VL

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
            100                 105                 110
```

<210> 6
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 VH

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

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

```
Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
        115                 120                 125
```

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 VL

<400> 7

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
            100                 105                 110
```

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 VH

<400> 8

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
```

20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
115 120

<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 VL

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Ala Asp
115

<210> 10
<211> 140
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 VH

<400> 10

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile Gly
50 55 60

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
65 70 75 80

Asp Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Ala Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
85 90 95

Glu Val Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
100 105 110

Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
130 135 140

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 VL

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ala Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
100 105 110

<210> 12
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 VH

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 VL

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp
100 105 110

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 VH

<400> 14

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

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

Leu Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 VL

<400> 15

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg
85 90 95

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

<210> 16
<211> 118

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 VH

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 VL

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE21 VH

<400> 18

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

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mE21 VL

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 HCDR3

<400> 20

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 HCDR2

<400> 21

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 HCDR1

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Trp
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 LCDR3

<400> 23

Trp Gln Asp Arg His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 24
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 LCDR2

<400> 24

Leu Val Ser
1

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA105 LCDR1

<400> 25

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA39 HCDR3

<400> 26

Ala Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA39 HCDR2

<400> 27

Ile Leu Pro Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA39 HCDR1

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Asn Ile Tyr Trp
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA39 LCDR3

<400> 29

Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA39 LCDR2

<400> 30

Asn Ala Lys
1

<210> 31
<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA38 LCDR1

<400> 31

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 HCDR3

<400> 32

Ala Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 HCDR2

<400> 33

Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 HCDR1

<400> 34

Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 LCDR3

<400> 35

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 36
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 LCDR2

<400> 36

Arg Ala Asn
1

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 LCDR1

<400> 37

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 HCDR3

<400> 38

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asn Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 HCDR2

<400> 39

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 HCDR1

<400> 40

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 LCDR3

<400> 41

Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 42
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 LCDR2

<400> 42

Leu Val Ser
1

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA71 LCDR1

<400> 43

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 HCDR3

<400> 44

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 HCDR2

<400> 45

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 HCDR1

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 LCDR3

<400> 47

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Gln Thr
1 5

<210> 48
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 LCDR2

<400> 48

Leu Val Cys
1

<210> 49
<211> 11
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 LCDR1

<400> 49

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 HCDR3

<400> 50

Thr Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 HCDR2

<400> 51

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 HCDR1

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 LCDR3

<400> 53

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 54
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 LCDR2

<400> 54

Ser Ala Ser
1

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB109 LCDR1

<400> 55

Gln Asp Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 HCDR3

<400> 56

Ala Arg Leu Ser Thr Gly Thr Arg Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 HCDR2

<400> 57

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Ala
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 HCDR1

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Ser Trp
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 LCDR3

<400> 59

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 60
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 LCDR2

<400> 60

Asn Ala Lys
1

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mB28 LCDR1

<400> 61

Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 HCDR3

<400> 62

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 HCDR2

<400> 63

Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 HCDR1

<400> 64

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 LCDR3

<400> 65

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 66
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 LCDR2

<400> 66

Arg Ala Asn
1

<210> 67
<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mC45 LCDR1

<400> 67

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 HCDR3

<400> 68

Ala Arg Gly Leu Arg His Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 HCDR2

<400> 69

Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 HCDR1

<400> 70

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 LCDR3

<400> 71

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 72
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 LCDR2

<400> 72

Ser Ala Ser
1

<210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE16 LCDR1

<400> 73

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE21 HCDR3

<400> 74

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE21 HCDR2

<400> 75

Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE21 HCDR1

<400> 76

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE21 LCDR3

<400> 77

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE21 LCDR2

<400> 78

Tyr Thr Ser
1

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mE21 LCDR1

<400> 79

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 80
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 VH

<400> 80

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

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

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

Ala Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro
115 120

<210> 81
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA75 VL

<400> 81

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

Gln Pro Ala Ser Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu
20 25 30

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

Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Cys Lys Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Arg Val Glu Gly Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Ser

85 90 95

His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala Asp

<210> 82
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC1a

<400> 82

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC1b

<400> 83

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 84
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC2a

<400> 84

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
```

85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC2b

<400> 85

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 86
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC3

<400> 86

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 87
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC4

<400> 87

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
```

85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC5a

<400> 88

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC5b

<400> 89

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
            20                  25                  30

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

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 90
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC5c

<400> 90

```
Gln Met 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 Met Thr Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys
    50                  55                  60

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

Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
```

85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC1a

<400> 91

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC1b

<400> 92

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

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

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

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

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

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC2

<400> 93

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 94

<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC3

<400> 94

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC4

<400> 95

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 96
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC5a

<400> 96

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC5b

<400> 97

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC5c

<400> 98

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 99
<211> 255
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CH

<400> 99

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
```

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
245 250 255

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CL

<400> 100

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 101
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> vk1

<400> 101

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 102
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> vlambda3

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)..(87)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 102

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

Thr Ala Ser Ile Thr Xaa Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Gln Asp Ser Lys 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 Xaa Gln Ala Trp Asp Ser Ser Ala Val Val
85 90 95

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

<210> 103
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> vh2

<400> 103

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> vh4

<220>
<221> misc_feature

<222> (22)..(22)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (95)..(95)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 104

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

Thr Leu Ser Leu Thr Xaa Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Xaa Ala
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain 3'- Primer

<400> 105
tatgcaaggc ttacaaccac a 21

<210> 106
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain 3'- Primer

<400> 106

ctcattcctg ttgaagctct tgag 24

<210> 107
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IGKV1-33-01_IGKJ4-01

<400> 107

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 108
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02

<400> 108

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv1LC1a x HC1a

<400> 109

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile

130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 110
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv2LC1b x HC1b

<400> 110

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

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

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

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

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

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Ile Lys Glu Met Gln Leu Gln
100 105 110

```
Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 111
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv3LC2 x HC2a

<400> 111

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

```
Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 112
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv4LC1a x HC2b

<400> 112

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45
```

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 113
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv5LC2 x HC2b

<400> 113

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
```

20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 114
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv6LC3 x HC3

<400> 114

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 115

<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv7LC4 x HC4

<400> 115

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220
```

Ser Ser
225

<210> 116
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv8LC5a x HC5a

<400> 116

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

```
Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 117
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv9LC5b x HC5b

<400> 117

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160
```

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 118
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv10LC5c x HC5c

<400> 118

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
100 105 110

Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile

130 135 140

Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 119
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv11LC2 x HC3

<400> 119

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
100 105 110

```
Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225


<210>  120
<211>  226
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence

<220>
<223>  A44-hv12LC4 X HC3

<400>  120

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

```
Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 121
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv13LC2 x HC5b

<400> 121

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45
```

```
Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 122
<211> 226
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A44-hv14LC4 x HC5b

<400> 122

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
```

20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 123
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC1a

<400> 123
gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgtcca gcgtg 255

<210> 124
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC1b

<400> 124
gagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240

aagctgtcca gcgtg 255

<210> 125
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC2a

<400> 125
gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgtcca gcgtg 255

<210> 126
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC2b

<400> 126
gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgtcca gcgtg 255

<210> 127
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC3

<400> 127
cagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat caccatcacc cgggacacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgagca gcgtg 255

<210> 128
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC4

<400> 128
cagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgtccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggcagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat caccatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgagca gcgtg 255

<210> 129
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC5a

<400> 129
caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc 120

cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agtcccggat caccatcagc cggaacacca gcaagaacca gtacagcctg 240

aagctgagca gcgtg 255

<210> 130
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC5b

<400> 130
cagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc 120

cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agtcccggat caccatcagc cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg 240

aagctgagca gcgtg 255

<210> 131
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC5c

<400> 131
cagatgcagc tgcagcagag cggccctggc ctggtcaaac ccagccagac cctgagcctg 60

acctgcgcca tcagcggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagagc 120

cccagcagag gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacgcc 180

gtgtccgtga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg 240

cagctgagca gcgtg 255

<210> 132
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC1a

<400> 132
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg gcatc 255

<210> 133
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC1b

<400> 133
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgtgt ctcctggcca gaccgtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggccagtccc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcaggcc 240

atggacgagg gcatc 255

<210> 134
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC2

<400> 134
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gcccagcgga gcgtggaagg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg gcatc 255

<210> 135
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC3

<400> 135
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg ccacc 255

<210> 136
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC4

<400> 136
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gcccagcgga gcgtggaagg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg ccacc 255

<210> 137
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC5a

<400> 137
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacc 255

<210> 138
<211> 255
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC5b

<400> 138
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacc 255

<210> 139
<211> 255
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LC5c

<400> 139
gagatcgtga tgacccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgagctgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagaaccct gatctaccgg gccaacagaa gcgtggacgg catccccgcc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtg 255

<210> 140
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 VH

<400> 140

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 141
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 VL

<400> 141

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 142
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mA44 VL

<400> 142

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe
115

<210> 143
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IGKV3-11-02_IGKJ4-0

<400> 143

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 144
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02

<400> 144

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

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

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

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

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

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

<210> 145
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 145

```
Arg Ala Gln
1
```

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 146

```
Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr
1               5
```

<210> 147
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 147

Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr
1 5

<210> 148
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 148

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 149
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 149

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

```
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

Glu His Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 150

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 151
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)..(103)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 151

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 152
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)..(103)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 152

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 153
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 153

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 154
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 154

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

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

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 155
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 155

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

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

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 156
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 156

Glu Xaa Xaa Gln
1

<210> 157
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 157

Leu Xaa Arg
1

<210> 158
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 158

Thr Asp Xaa Xaa Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Xaa Xaa Ser Asp
1 5 10 15

Gln Glu Pro Leu
20

<210> 159
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 159

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Arg Gln Gln Ile Gln
1 5 10

<210> 160
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 160

Arg His Leu
1

<210> 161
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 161

Thr Asp Met Xaa Xaa Xaa Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn
1 5 10 15

Gln Glu Pro Leu His Val
20

<210> 162
<211> 402
<212> PRT
<213> cynomolgus

<400> 162

Met Gln Met Ser Pro Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Phe
1 5 10 15

Val Phe Gly Glu Gly Ser Thr Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala
20 25 30

His Leu Ala Ser Asp Phe Gly Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln
35 40 45

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

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

Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro
85 90 95

Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys Glu Leu Leu Gly Pro Trp Asn Lys Asp
100 105 110

Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu
115 120 125

```
Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val
    130                 135                 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Ala Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145                 150                 155                 160

Asp Trp Val Lys Thr His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Gly
                165                 170                 175

Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
            180                 185                 190

Tyr Phe Asn Gly His Trp Lys Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His
        195                 200                 205

Arg Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met
    210                 215                 220

Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225                 230                 235                 240

Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Asn Thr Leu
                245                 250                 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Tyr Glu Lys Gln Val Pro Leu Ser Ala
            260                 265                 270

Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn
        275                 280                 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
    290                 295                 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys Pro Leu Glu Asn Leu Gly Met Thr Asp
305                 310                 315                 320

Met Phe Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn Gln Glu
                325                 330                 335

Pro Leu His Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn
            340                 345                 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala
        355                 360                 365

Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val
    370                 375                 380
```

```
Val Arg His Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met
385                 390                 395                 400


Glu Pro
```

<210> 163
<211> 402
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 163

```
Met Gln Met Ser Ser Ala Leu Ala Cys Leu Ile Leu Gly Leu Val Leu
1               5                   10                  15


Val Ser Gly Lys Gly Phe Thr Leu Pro Leu Arg Glu Ser His Thr Ala
            20                  25                  30


His Gln Ala Thr Asp Phe Gly Val Lys Val Phe Gln Gln Val Val Gln
        35                  40                  45


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


Val Leu Ala Met Leu Gln Met Thr Thr Ala Gly Lys Thr Arg Arg Gln
65                  70                  75                  80


Ile Gln Asp Ala Met Gly Phe Lys Val Asn Glu Lys Gly Thr Ala His
                85                  90                  95


Ala Leu Arg Gln Leu Ser Lys Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asn
            100                 105                 110


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


Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Lys Leu Phe Gln Thr Met Val
    130                 135                 140


Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145                 150                 155                 160


Asp Trp Val Glu Arg His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Ala
                165                 170                 175


Lys Gly Ala Val Asp Glu Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
            180                 185                 190
```

```
Tyr Phe Ser Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Leu Glu Ala Ser Thr His
        195                 200                 205

Gln Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met
    210                 215                 220

Met Ala Gln Ser Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225                 230                 235                 240

Gly Leu Glu Tyr Asp Val Val Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Phe Glu Lys Asp Val His Leu Ser Ala
            260                 265                 270

Leu Thr Asn Ile Leu Asp Ala Glu Leu Ile Arg Gln Trp Lys Gly Asn
        275                 280                 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Ile Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
    290                 295                 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Gly Pro Leu Glu Lys Leu Gly Met Pro Asp
305                 310                 315                 320

Met Phe Ser Ala Thr Leu Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu
                325                 330                 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Arg Ile Glu Val Asn
            340                 345                 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Phe Val Ile Ser Ala
        355                 360                 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Ile Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val
    370                 375                 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Val Met
385                 390                 395                 400

Glu Pro
```

<210> 164
<211> 402
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 164

```
Met Gln Met Ser Ser Ala Leu Thr Cys Leu Thr Leu Gly Leu Val Leu
1               5                  10                  15

Val Phe Gly Lys Gly Phe Ala Ser Pro Leu Pro Glu Ser His Thr Ala
            20                  25                  30

Gln Gln Ala Thr Asn Phe Gly Val Lys Val Phe Gln His Val Val Gln
        35                  40                  45

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

Val Leu Ala Met Leu Gln Leu Thr Thr Ala Gly Lys Thr Arg Gln Gln
65                  70                  75                  80

Ile Gln Asp Ala Met Gly Phe Asn Ile Ser Glu Arg Gly Thr Ala Pro
                85                  90                  95

Ala Leu Arg Lys Leu Ser Lys Glu Leu Met Gly Ser Trp Asn Lys Asn
            100                 105                 110

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

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Lys Leu Phe Arg Thr Thr Val
    130                 135                 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145                 150                 155                 160

Asp Trp Val Glu Arg His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Ala
                165                 170                 175

Lys Gly Ala Val Asn Glu Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
            180                 185                 190

Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Leu Glu Ala Ser Thr His
        195                 200                 205

Gln Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Ile Ser Val Pro Met
    210                 215                 220

Met Ala Gln Asn Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225                 230                 235                 240

Gly His Glu Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Thr Leu
```

245 250 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Phe Glu Lys Asp Val Pro Leu Ser Ala
260 265 270

Ile Thr Asn Ile Leu Asp Ala Glu Leu Ile Arg Gln Trp Lys Ser Asn
275 280 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Ile Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
290 295 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Gly Pro Leu Glu Lys Leu Gly Met Thr Asp
305 310 315 320

Ile Phe Ser Ser Thr Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu
325 330 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Ile Leu Val Ser Ala
355 360 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Leu Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Leu Met
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 165
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 165

Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 166

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 167
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 167

Arg Ala Asn
1

<210> 168
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 168

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 169

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 170
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 170

Arg Ala Asn
1

LISTADO DE SECUENCIAS REVISADO EN INGLES

LISTA DE SECUENCIAS FINAL EN ESPAÑOL
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sanofi

<120> AAnticuerpos contra el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y usos de los mismos

<130> 13-596-WO

<140> PCT/US2014/050896
<141> 2014-08-13

<160> 170

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala His Leu Ala Ser Asp Phe Gly
1 5 10 15

Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val
20 25 30

Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser Val Leu Ala Met Leu Gln Leu
35 40 45

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Gln Gln Gln Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe
50 55 60

Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asp Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala
85 90 95

Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu Val Gln Gly Phe Met Pro His
100 105 110

Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu
115 120 125

Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn Asp Trp Val Lys Thr His Thr
130 135 140

Lys Gly Met Ile Ser Asn Leu Leu Gly Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu
145 150 155 160

```
Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys
                165                 170                 175

Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His Arg Arg Leu Phe His Lys Ser
            180                 185                 190

Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe
        195                 200                 205

Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu
    210                 215                 220

Glu Leu Pro Tyr His Gly Asp Thr Leu Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro
225                 230                 235                 240

Tyr Glu Lys Glu Val Pro Leu Ser Ala Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala
                245                 250                 255

Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu
            260                 265                 270

Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys
        275                 280                 285

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

Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu Pro Leu His Val Ala Gln Ala
305                 310                 315                 320

Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser
                325                 330                 335

Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile
            340                 345                 350

Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Val Arg His Asn Pro Thr Gly
        355                 360                 365

Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met Glu Pro
    370                 375
```

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 VH

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
        115                 120
```

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 VL

<400> 3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

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

Pro Gln Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

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

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

Arg Ala Asp
        115
```

<210> 4
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA39 VH

<400> 4

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

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

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

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

Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met
65                  70                  75                  80

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

Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
        115                 120                 125
```

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA39 VL

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 VH

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 VL

<400> 7

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 VH

<400> 8

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
115 120

<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 VL

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Ala Asp
115

<210> 10
<211> 140
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 VH

<400> 10

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile Gly
50 55 60

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
65 70 75 80

Asp Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Ala Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
85 90 95

Glu Val Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
100 105 110

Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
130 135 140

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 VL

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ala Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
100 105 110

<210> 12
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB28 VH

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

```
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
        115                 120                 125


<210>  13
<211>  110
<212>  PRT
<213>  Secuencia Artificial

<220>
<223>  mB28 VL

<400>  13

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


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


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


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


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


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


Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp
            100                 105                 110


<210>  14
<211>  121
<212>  PRT
<213>  Secuencia Artificial

<220>
<223>  mC45 VH

<400>  14

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


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


Leu Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
```

35 40 45

Gly Val Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mC45 VL

<400> 15

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg
85 90 95

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

<210> 16
<211> 118

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 VH

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 VL

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE21 VH

<400> 18

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

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mE21 VL

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 HCDR3

<400> 20

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 HCDR2

<400> 21

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 HCDR1

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Trp
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 LCDR3

<400> 23

Trp Gln Asp Arg His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 24
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 LCDR2

<400> 24

Leu Val Ser
1

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA105 LCDR1

<400> 25

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA39 HCDR3

<400> 26

Ala Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA39 HCDR2

<400> 27

Ile Leu Pro Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA39 HCDR1

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Asn Ile Tyr Trp
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA39 LCDR3

<400> 29

Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA39 LCDR2

<400> 30

Asn Ala Lys
1

<210> 31
<211> 6
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA38 LCDR1

<400> 31

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 HCDR3

<400> 32

Ala Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 HCDR2

<400> 33

Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 HCDR1

<400> 34

Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 LCDR3

<400> 35

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 36
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 LCDR2

<400> 36

Arg Ala Asn
1

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 LCDR1

<400> 37

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 HCDR3

<400> 38

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asn Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 HCDR2

<400> 39

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 HCDR1

<400> 40

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 LCDR3

<400> 41

Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 42
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 LCDR2

<400> 42

Leu Val Ser
1

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA71 LCDR1

<400> 43

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 HCDR3

<400> 44

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 HCDR2

<400> 45

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 HCDR1

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 LCDR3

<400> 47

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Gln Thr
1 5

<210> 48
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 LCDR2

<400> 48

Leu Val Cys
1

<210> 49
<211> 11
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 LCDR1

<400> 49

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 HCDR3

<400> 50

Thr Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 HCDR2

<400> 51

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 HCDR1

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 LCDR3

<400> 53

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 54
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 LCDR2

<400> 54

Ser Ala Ser
1

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB109 LCDR1

<400> 55

Gln Asp Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB28 HCDR3

<400> 56

Ala Arg Leu Ser Thr Gly Thr Arg Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB28 HCDR2

<400> 57

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Ala
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB28 HCDR1

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Ser Trp
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB28 LCDR3

<400> 59

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 60
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB28 LCDR2

<400> 60

Asn Ala Lys
1

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mB28 LCDR1

<400> 61

Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mC45 HCDR3

<400> 62

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mC45 HCDR2

<400> 63

Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mC45 HCDR1

<400> 64

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mC45 LCDR3

<400> 65

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 66
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mC45 LCDR2

<400> 66

Arg Ala Asn
1

<210> 67
<211> 6
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mC45 LCDR1

<400> 67

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 HCDR3

<400> 68

Ala Arg Gly Leu Arg His Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 HCDR2

<400> 69

Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 HCDR1

<400> 70

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 LCDR3

<400> 71

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 72
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 LCDR2

<400> 72

Ser Ala Ser
1

<210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE16 LCDR1

<400> 73

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE21 HCDR3

<400> 74

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE21 HCDR2

<400> 75

Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE21 HCDR1

<400> 76

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE21 LCDR3

<400> 77

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE21 LCDR2

<400> 78

Tyr Thr Ser
1

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mE21 LCDR1

<400> 79

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 80
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 VH

<400> 80

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

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

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

Ala Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro
115 120

<210> 81
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA75 VL

<400> 81

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

Gln Pro Ala Ser Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu
20 25 30

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

Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Cys Lys Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Arg Val Glu Gly Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Ser

85 90 95

His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala Asp

<210> 82
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC1a

<400> 82

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC1b

<400> 83

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC2a

<400> 84

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC2b

<400> 85

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 86
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC3

<400> 86

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 87
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC4

<400> 87

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC5a

<400> 88

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC5b

<400> 89

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


Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
            20                  25                  30


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


Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60


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


Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95


Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110


Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115


<210>  90
<211>  119
<212>  PRT
<213>  Secuencia Artificial

<220>
<223>  HC5c

<400>  90

Gln Met 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 Met Thr Asn Gly
            20                  25                  30


Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met
        35                  40                  45


Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys
    50                  55                  60


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


Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
```

85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC1a

<400> 91

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC1b

<400> 92

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

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

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

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

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

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC2

<400> 93

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 94

<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC3

<400> 94

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC4

<400> 95

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 96
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC5a

<400> 96

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC5b

<400> 97

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC5c

<400> 98

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

LISTA DE SECUENCIAS FINAL EN ESPAÑOL

<210> 99
<211> 255
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CH

<400> 99

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
```

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
245 250 255

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CL

<400> 100

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 101
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vk1

<400> 101

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 102
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlambda3

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (22)..(22)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (87)..(87)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 102

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

Thr Ala Ser Ile Thr Xaa Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Gln Asp Ser Lys 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 Xaa Gln Ala Trp Asp Ser Ser Ala Val Val
85 90 95

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

<210> 103
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vh2

<400> 103

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vh4

<220>
<221> característica miscelánea

<222> (22)..(22)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (95)..(95)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 104

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

Thr Leu Ser Leu Thr Xaa Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Xaa Ala
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador 3' de cadena pesada

<400> 105
tatgcaaggc ttacaaccac a 21

<210> 106
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador 3' de cadena ligera

<400> 106

ctcattcctg ttgaagctct tgag 24

<210> 107
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IGKV1-33-01_IGKJ4-01

<400> 107

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 108
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02

<400> 108

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv1LC1a x HC1a

<400> 109

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile

130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 110
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv2LC1b x HC1b

<400> 110

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

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

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

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

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

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Ile Lys Glu Met Gln Leu Gln
100 105 110

```
Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 111
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv3LC2 x HC2a

<400> 111

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

```
Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 112
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv4LC1a x HC2b

<400> 112

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45
```

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 113
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv5LC2 x HC2b

<400> 113

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 114
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv6LC3 x HC3

<400> 114

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 115

<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv7LC4 x HC4

<400> 115

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220
```

Ser Ser
225

<210> 116
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv8LC5a x HC5a

<400> 116

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 117
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv9LC5b x HC5b

<400> 117

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

```
Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 118
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv10LC5c x HC5c

<400> 118

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
            100                 105                 110

Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
```

130 135 140

Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 119
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv11LC2 x HC3

<400> 119

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
100 105 110

```
Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 120
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv12LC4 X HC3

<400> 120

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

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

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

```
Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys
            100                 105                 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr
        115                 120                 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
    130                 135                 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile
                165                 170                 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
        195                 200                 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
    210                 215                 220

Ser Ser
225
```

<210> 121
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv13LC2 x HC5b

<400> 121

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45
```

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 122
<211> 226
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A44-hv14LC4 x HC5b

<400> 122

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 123
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC1a

<400> 123
gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgtcca gcgtg 255

<210> 124
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC1b

<400> 124
gagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240

aagctgtcca gcgtg 255

<210> 125
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC2a

<400> 125
gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgtcca gcgtg 255

<210> 126
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC2b

<400> 126
gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgtcca gcgtg 255

<210> 127
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC3

<400> 127
cagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat caccatcacc cgggacacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgagca gcgtg 255

<210> 128
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC4

<400> 128
cagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60

acctgcagcg tgtccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggcagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat caccatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgagca gcgtg 255

<210> 129
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC5a

<400> 129
caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc 120

cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agtcccggat caccatcagc cggaacacca gcaagaacca gtacagcctg 240

aagctgagca gcgtg 255

<210> 130
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC5b

<400> 130
cagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc 120

cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agtcccggat caccatcagc cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg 240

aagctgagca gcgtg 255

<210> 131
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC5c

<400> 131
cagatgcagc tgcagcagag cggccctggc ctggtcaaac ccagccagac cctgagcctg 60

acctgcgcca tcagcggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagagc 120

cccagcagag gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacgcc 180

gtgtccgtga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg 240

cagctgagca gcgtg 255

<210> 132
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC1a

<400> 132
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg gcatc 255

<210> 133
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC1b

<400> 133
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc gtgtccgtgt ctcctggcca gaccgtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggccagtccc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcaggcc 240

atggacgagg gcatc 255

<210> 134
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC2

<400> 134
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gcccagcgga gcgtggaagg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg gcatc 255

<210> 135
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC3

<400> 135
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg ccacc 255

<210> 136
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC4

<400> 136
gacatcaaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gcccagcgga gcgtggaagg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg ccacc 255

<210> 137
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC5a

<400> 137
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacc 255

<210> 138
<211> 255
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC5b

<400> 138
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaagc 180

agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacc 255

<210> 139
<211> 255
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC5c

<400> 139
gagatcgtga tgacccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgagctgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagaaccct gatctaccgg gccaacagaa gcgtggacgg catccccgcc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtg 255

<210> 140
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 VH

<400> 140

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 141
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 VL

<400> 141

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 142
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mA44 VL

<400> 142

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
85 90 95

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe
115

<210> 143
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IGKV3-11-02_IGKJ4-0

<400> 143

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 144
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02

<400> 144

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

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

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

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

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

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

<210> 145
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 145

```
Arg Ala Gln
1
```

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 146

```
Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr
1               5
```

<210> 147
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 147

Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr
1 5

<210> 148
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 148

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 149
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 149

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

```
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

Glu His Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 150

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 151
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (99)..(103)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 151

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 152
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (99)..(103)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 152

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 153
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 153

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 154
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 154

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

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

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 155
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 155

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

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

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 156
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 156

Glu Xaa Xaa Gln
1

<210> 157
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 157

Leu Xaa Arg
1

<210> 158
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (3)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (13)..(14)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 158

Thr Asp Xaa Xaa Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Xaa Xaa Ser Asp
1 5 10 15

Gln Glu Pro Leu
20

<210> 159
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 159

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Arg Gln Gln Ile Gln
1 5 10

<210> 160
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 160

Arg His Leu
1

<210> 161
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (4)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 161

Thr Asp Met Xaa Xaa Xaa Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn
1 5 10 15

Gln Glu Pro Leu His Val
20

<210> 162
<211> 402
<212> PRT
<213> cynomolgus

<400> 162

Met Gln Met Ser Pro Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Phe
1 5 10 15

Val Phe Gly Glu Gly Ser Thr Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala
20 25 30

His Leu Ala Ser Asp Phe Gly Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln
35 40 45

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

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

Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro
85 90 95

Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys Glu Leu Leu Gly Pro Trp Asn Lys Asp
100 105 110

Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu
115 120 125

```
Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val
    130                 135                 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Ala Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145                 150                 155                 160

Asp Trp Val Lys Thr His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Gly
                165                 170                 175

Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
            180                 185                 190

Tyr Phe Asn Gly His Trp Lys Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His
        195                 200                 205

Arg Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met
    210                 215                 220

Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225                 230                 235                 240

Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Asn Thr Leu
                245                 250                 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Tyr Glu Lys Gln Val Pro Leu Ser Ala
            260                 265                 270

Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn
        275                 280                 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
    290                 295                 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys Pro Leu Glu Asn Leu Gly Met Thr Asp
305                 310                 315                 320

Met Phe Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn Gln Glu
                325                 330                 335

Pro Leu His Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn
            340                 345                 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala
        355                 360                 365

Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val
    370                 375                 380
```

```
Val Arg His Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met
385                 390                 395                 400


Glu Pro
```

<210> 163
<211> 402
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 163

```
Met Gln Met Ser Ser Ala Leu Ala Cys Leu Ile Leu Gly Leu Val Leu
1               5                   10                  15


Val Ser Gly Lys Gly Phe Thr Leu Pro Leu Arg Glu Ser His Thr Ala
            20                  25                  30


His Gln Ala Thr Asp Phe Gly Val Lys Val Phe Gln Gln Val Val Gln
        35                  40                  45


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


Val Leu Ala Met Leu Gln Met Thr Thr Ala Gly Lys Thr Arg Arg Gln
65                  70                  75                  80


Ile Gln Asp Ala Met Gly Phe Lys Val Asn Glu Lys Gly Thr Ala His
                85                  90                  95


Ala Leu Arg Gln Leu Ser Lys Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asn
            100                 105                 110


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


Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Lys Leu Phe Gln Thr Met Val
    130                 135                 140


Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145                 150                 155                 160


Asp Trp Val Glu Arg His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Ala
                165                 170                 175


Lys Gly Ala Val Asp Glu Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
            180                 185                 190
```

```
Tyr Phe Ser Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Leu Glu Ala Ser Thr His
        195                 200                 205

Gln Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met
    210                 215                 220

Met Ala Gln Ser Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225                 230                 235                 240

Gly Leu Glu Tyr Asp Val Val Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Phe Glu Lys Asp Val His Leu Ser Ala
            260                 265                 270

Leu Thr Asn Ile Leu Asp Ala Glu Leu Ile Arg Gln Trp Lys Gly Asn
        275                 280                 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Ile Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
    290                 295                 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Gly Pro Leu Glu Lys Leu Gly Met Pro Asp
305                 310                 315                 320

Met Phe Ser Ala Thr Leu Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu
                325                 330                 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Arg Ile Glu Val Asn
            340                 345                 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Phe Val Ile Ser Ala
        355                 360                 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Ile Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val
    370                 375                 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Val Met
385                 390                 395                 400

Glu Pro
```

<210> 164
<211> 402
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

LISTA DE SECUENCIAS FINAL EN ESPAÑOL

<400> 164

```
Met Gln Met Ser Ser Ala Leu Thr Cys Leu Thr Leu Gly Leu Val Leu
1               5                  10                  15

Val Phe Gly Lys Gly Phe Ala Ser Pro Leu Pro Glu Ser His Thr Ala
            20                  25                  30

Gln Gln Ala Thr Asn Phe Gly Val Lys Val Phe Gln His Val Val Gln
        35                  40                  45

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

Val Leu Ala Met Leu Gln Leu Thr Thr Ala Gly Lys Thr Arg Gln Gln
65                  70                  75                  80

Ile Gln Asp Ala Met Gly Phe Asn Ile Ser Glu Arg Gly Thr Ala Pro
                85                  90                  95

Ala Leu Arg Lys Leu Ser Lys Glu Leu Met Gly Ser Trp Asn Lys Asn
            100                 105                 110

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

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Lys Leu Phe Arg Thr Thr Val
    130                 135                 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
145                 150                 155                 160

Asp Trp Val Glu Arg His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Ala
                165                 170                 175

Lys Gly Ala Val Asn Glu Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
            180                 185                 190

Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Leu Glu Ala Ser Thr His
        195                 200                 205

Gln Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Ile Ser Val Pro Met
    210                 215                 220

Met Ala Gln Asn Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
225                 230                 235                 240

Gly His Glu Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Thr Leu
```

245 250 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Phe Glu Lys Asp Val Pro Leu Ser Ala
260 265 270

Ile Thr Asn Ile Leu Asp Ala Glu Leu Ile Arg Gln Trp Lys Ser Asn
275 280 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Ile Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu
290 295 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Gly Pro Leu Glu Lys Leu Gly Met Thr Asp
305 310 315 320

Ile Phe Ser Ser Thr Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu
325 330 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Ile Leu Val Ser Ala
355 360 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Leu Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Leu Met
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 165
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 165

Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 166

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 167
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 167

Arg Ala Asn
1

<210> 168
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 168

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 169

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 170
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 170

Arg Ala Asn
1

LISTA DE SECUENCIAS FINAL EN ESPAÑOL

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente al Inhibidor del Activador de Plasminógeno de tipo 1 (PAI-1). La invención también proporciona composiciones farmacéuticas, así como ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-PAI-1, vectores de expresión recombinantes y células hospedantes para preparar tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos. También se proporcionan métodos de uso de anticuerpos para modular la actividad de PAI-1 o detectar PAI-1, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Además la descripción proporciona métodos de producción de anticuerpos que se unen específicamente a PAI-1 en el estado conformacional activo.