



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-061429-00000-0000

Fecha: 2015-03-17 15:45:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95-96

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-149294-00012-0000

Fecha: 2015-03-17 15:45:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 95-96

Delegatura de Propiedad Intelectual

División de Nuevas Creaciones

JF

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

PCT- FASE NACIONAL

DIVISION EXP. 12-149.294

21. EXPEDIENTE No.

22. TITULO **ANTICUERPOS MONOCLONALES OPTIMIZADOS CONTRA
EL INHIBIDOR DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)**

CLASIFICACION
INTERNACIONAL

SOLICITANTES **BAYER HEALTHCARE LLC**

DOMICILIO **NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

APODERADO **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

Bogotá, D.C.,



No. 15-061429-00000-0000

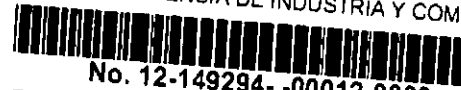
Fecha: 2015-03-17 15:45:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95-96

DIVISION EXP. 1

DIRECCIÓN DE NUEVAS PATENTES

SOLICITUD FASE NA

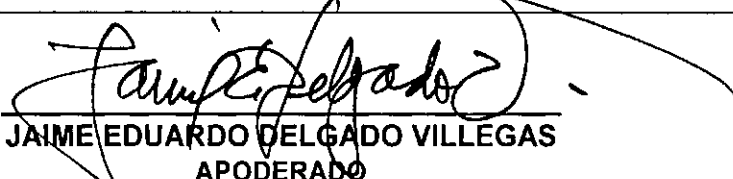
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-149294-00012-0000

Fecha: 2015-03-17 15:45:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 95-96

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I		
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)			
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/026766		
Publicación Internacional No.		WO2011/109452 A1		Fecha 09/09/2011
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)			
ANTICUERPOS MONOCLONALES OPTIMIZADOS CONTRA EL INHIBIDOR DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)				
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
BAYER HEALTHCARE LLC				[1]
6	DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN		555 White Plains Road Tarrytown		No. TELÉFONO
CIUDAD		NEW YORK 10591		CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO				NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN US
PAÍS DE RESIDENCIA		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD	
1. WANG,		Zhuozhi	CN	
2. PAN,		Junliang	US	
3. GRUDZINSKA,		Joanna	DE	
4. VOTSMEIER,		Christian	DE	
5. TEBBE,		Jan	DE	
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:				
8	DATOS INVENTOR (ES)			
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. ESTADOS UNIDOS			CALIFORNIA 94030	1388 Broadway, Unit 383 Millbrae
2. ESTADOS UNIDOS			CALIFORNIA 94556	7 Ketelsen Court Moraga
3. ALEMANIA			BERLIN	Liselotte-Herrmannstr. 11 10407
4. ALEMANIA			COLOGNE	Pellenzstrasse 25 50823
5. ALEMANIA			COLOGNE	Am Alten Stellwerk 16 50733
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)				
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.				
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO			
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN	
DELGADO VILLEGAS		JAIME EDUARDO	C.C. 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.J.	
DIRECCIÓN		Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202		No. TELÉFONO 2444096
CIUDAD		BOGOTA D.C.		CORREO ELECTRÓNICO mde@mdelaw.com
PAÍS		COLOMBIA		
No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL				
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		US	61/309,290	01/03/2010

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐ Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
 JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS APODERADO			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 82 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 8 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 5 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes, si fuera el caso. <i>Adjunto en exp. 12149294</i> 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. <i>Adjunto en exp. 12149294</i> 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

1

(12) TIPO DE SOLICITUD

☒ Patente de invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

FECHA DE PRESENTACIÓN

4

(71) SOLICITANTE (S)

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL

NOMBRE

IDENTIFICACIÓN

TIPO

1.

5

DATOS DEL SOLICITANTE

PAÍS DE RESIDENCIA

DEPARTAMENTO/ESTADO

CIUDAD

DIRECCIÓN

TELÉFONO

FAX

E-MAIL

NACIONALIDAD

2.

6

(72) INVENTOR (ES)

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

6. BIRKENFELD,

7. WOBST,

8. BRUECKNER,

9. STEINIG,

10. SCHOLZ,

Joerg

Nina

Simone

Susanne

Peter

DE

DE

DE

DE

DE

7

DATOS INVENTOR (ES)

DIRECCIÓN

CIUDAD

ESTADO

PAÍS RESIDENCIA

6. Kurfürstenstr. 3 60486

7. Hummelsbergstraße 7 50939

8. Zedernweg 2 50259

9. Untere Dorfstr. 41a 50829

10. Biesenkamp 10 47533

FRANKFURT AM MAIN

KÖLN

PULHEIM

COLOGNE

KLEVE

ALEMANIA

ALEMANIA

ALEMANIA

ALEMANIA

ALEMANIA

9

(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO PAÍS

NÚMERO

FECHA (AAAA/MM/DD)

3.

4.

5.

6.

7.

**ANTICUERPOS MONOCLONALES OPTIMIZADOS CONTRA EL INHIBIDOR
DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)**

Zhuozhi Wang, Junliang Pan, Joanna Grudzinska, Christian Votsmeier,
Jan Tebbe, Joerg Birkenfeld, Nina Wobst, Simone Brückner, Susanne Steinig,
Peter Scholz

Presentación del listado de secuencias

El listado de secuencias asociado con la presente solicitud se presenta en formato electrónico a través de EFS-Web y se incorpora de dicha forma por referencia en la especificación en su totalidad.

Campo de las formas de realización

Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados y fragmentos de los mismos que se unen al inhibidor de la vía del factor tisular humano (TFPI).

Antecedentes

La coagulación sanguínea es un proceso por el cual la sangre forma coágulos estables para detener el sangrado. El proceso implica una serie de proenzimas y procofactores (o "factores de coagulación") que están circulando en la sangre. Las proenzimas y procofactores interaccionan a través de varias vías mediante las cuales se convierte, bien secuencial o simultáneamente, en la forma activada. En última instancia, el proceso da como resultado la activación de protrombina en trombina mediante el Factor X activado (FXa) en presencia del Factor Va, calcio iónico y plaquetas. A su vez, la trombina

activada induce la agregación plaquetaria y convierte el fibrinógeno en fibrina, que después se reticula mediante el Factor XIII activado (FXIIIa) para formar un coágulo.

El proceso que conduce a la activación del Factor X se puede llevar a cabo mediante dos vías distintas: la vía de activación por contacto (antes conocida como la vía intrínseca) y la vía del factor tisular (anteriormente conocida como la vía extrínseca). Antes se pensaba que la cascada de la coagulación consistía en dos vías de igual importancia unidas por una vía común. Actualmente se sabe que la vía principal para el inicio de la coagulación de la sangre es la vía del factor tisular.

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

La vía del factor tisular de la coagulación está controlada negativamente por el inhibidor de la vía del factor tisular ("TFPI"). El TFPI es un inhibidor de retroalimentación, natural dependiente de FXa del complejo FVIIa/TF. Es un miembro de los inhibidores serina-proteasa multivalentes de tipo Kunitz. Fisiológicamente, el TFPI se une al Factor X activado (FXa) para formar un complejo heterodimérico, que posteriormente interacciona con el complejo FVIIa/TF para inhibir su actividad, de modo que cierra la vía de coagulación del factor tisular. En principio, el bloqueo de la actividad del TFPI puede restablecer la actividad de FXa y FVIIa/TF, de modo que se prolonga la

duración de la acción de la vía del factor tisular y se amplifica la generación de FXa, que es el defecto común en la hemofilia A y B.

De hecho, algunas pruebas experimentales preliminares han indicado que el bloqueo de la actividad de TFPI por los anticuerpos contra el TFPI normaliza el tiempo de coagulación prolongado o acorta el tiempo de sangrado. Por ejemplo, Nordfang y col. mostraron que el tiempo de protrombina diluida prolongado de hemofilia en plasma se normalice después de tratar el plasma con anticuerpos frente a TFPI (Thromb. Haemost., 1991, 66(4): 464-467). De forma similar, Erhardtsen y col. mostraron que el tiempo de sangrado en un modelo de conejo con hemofilia A se acortó significativamente con anticuerpos anti-TFPI (Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1995, 6: 388-394). Estos estudios sugieren que la inhibición del TFPI mediante anticuerpos anti-TFPI puede ser útil para el tratamiento de la hemofilia A o B. En estos estudios solo se usó el anticuerpo policlonal anti-TFPI.

Usando técnicas de hibridoma se prepararon e identificaron anticuerpos monoclonales contra el TFPI humano recombinante (rhTFPI). Véase Yang y col., Chin. Med. J., 1998, 111(8): 718-721. Se investigó el efecto del anticuerpo monoclonal sobre el tiempo de protrombina (PT) diluido y el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT). Los experimentos mostraron que el anticuerpo monoclonal anti-TFPI acortó el tiempo de coagulación de tromboplastina diluida del plasma deficiente en Factor IX. Se ha sugerido que la vía del factor tisular desempeña un papel importante, no sólo en la

coagulación fisiológica sino también en la hemorragia por hemofilia (Yang y col., Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1997, 22(4): 297-300).

En consecuencia, anticuerpos específicos para TFPI son necesarios para tratar enfermedades hematológicas y cáncer.

Generalmente, los anticuerpos terapéuticos para enfermedades humanas se han generado usando ingeniería genética para crear anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o completamente humanos. Se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales murinos tienen un uso limitado como agentes terapéuticos por una semivida sérica corta, una incapacidad para desencadenar funciones efectoras humanas y la producción de anticuerpos humanos anti-ratón (Brekke y Sandlie, "Therapeutic Antibodies for Human Diseases at the Dawn of the Twenty-first Century," *Nature* 2, 53, 52-62, Jan. 2003). Se ha mostrado que los anticuerpos quiméricos dan lugar a respuestas de anticuerpos humanos anti-quiméricos. Los anticuerpos humanizados minimizan además el componente de ratón de los anticuerpos. No obstante, un anticuerpo completamente humano evita la inmunogenicidad asociada con los elementos murinos completamente. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos completamente humanos para evitar la inmunogenicidad asociada con otras formas de anticuerpos monoclonales sometidos a ingeniería genética. En particular, el tratamiento profiláctico crónico tal como el que se requeriría para el tratamiento de la hemofilia con un anticuerpo monoclonal anti-TFPI tiene un riesgo elevado de desarrollar una

respuesta inmunitaria a la terapia si se usa un anticuerpo con un componente murino o de origen murino debido a la frecuente dosificación requerida y a la larga duración de la terapia. Por ejemplo, el tratamiento con anticuerpos de la hemofilia A puede requerir dosificación semanalmente durante la vida de un paciente. Esto sería un reto continuo para el sistema inmunitario. Por tanto, existe la necesidad de un anticuerpo completamente humano para la terapia con anticuerpos de la hemofilia y las deficiencias y defectos genéticos y adquiridos en la coagulación relacionados.

Los anticuerpos terapéuticos se han fabricado a través de tecnología de hibridoma descrita por Koehler y Milstein en "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity," *Nature* 256, 495-497 (1975). Los anticuerpos completamente humanos también pueden elaborarse de forma recombinante en procariotas y eucariotas. Para un anticuerpo terapéutico se prefiere la producción recombinante de un anticuerpo en una célula huésped en lugar de la producción de hibridoma. La producción recombinante tiene las ventajas de mayor consistencia del producto, probable mayor nivel de producción y una fabricación controlada que minimiza o elimina la presencia de proteínas derivadas de animales. Por estos motivos es deseable tener un anticuerpo monoclonal anti-TFPI producido de forma recombinante.

Además, dado que el TFPI se une al Factor X activado (FXa) con una elevada afinidad, un anticuerpo anti-TFPI eficaz debería tener una afinidad comparable. Por tanto, es deseable tener un anticuerpo anti-TFPI que tenga

afinidad de unión que pueda competir con la unión de TFPI/FXa.

Resumen

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

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales frente a TFPI proporcionados se han optimizado, por ejemplo para tener una mayor afinidad o una actividad funcional mayor.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa un gráfico de barras que ilustra variantes 2A8 seleccionadas con sustituciones de un solo aminoácido que mostraron más potencia en el acortamiento del tiempo de coagulación en el plasma humano de hemofilia A usando un ensayo de dPT.

La Figura 2 representa un gráfico de barras que representa el efecto de determinados anticuerpos anti-TFPI mutados en un solo aminoácido sobre el

tiempo de coagulación de sangre hemofílica humana inducida con anticuerpos anti-factor VIII.

La Figura 3 representa un gráfico de barras que muestra que 4B7-D62R tiene una potencia mucho mayor en el acortamiento del tiempo de coagulación en sangre de hemofilia A inducida con anticuerpo humano en comparación con el anticuerpo 4B7 parental y, en menor medida, en comparación con sustituciones de un solo aminoácido en 2A8.

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

La Figura 5 representa un gráfico que muestra que una variante de 2^A8 potenciada la coagulación en plasma de hemofilia humana C (deficiente en FXI) de un modo dependiente de la dosis y los efectos fueron comparables con los del FVIIa recombinante.

Descripción detallada

Definiciones

El término "inhibidor de la vía del factor tisular" o "TFPI" como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del TFPI humano que se expresa de forma natural en las células. En una forma de realización preferida de la invención, la unión de un

anticuerpo de la invención al TFPI reduce el tiempo de coagulación sanguínea.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, un “anticuerpo” se refiere a un anticuerpo entero y a cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, “porción de unión a antígeno”) o una cadena sencilla del mismo. El término incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (p. ej., un anticuerpo IgG) que es natural o se forma mediante procedimientos recombinantes de fragmento génico de inmunoglobulina normal o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento de anticuerpo, que conserva la actividad de unión específica. Con independencia de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-TFPI se une a un epítipo del TFPI. La función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab es un fragmento monovalente compuesto por los dominios V_L , V_H , C_L y CH_1 ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH_1 ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward y col., Nature 341 :544-546, 1989) que un dominio V_H ; (vi) una región determinante de

la complementariedad (CDR) aislada; (vii) minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (véase, por ejemplo, Ill y col., Protein Eng 1997;10:949-57); (viii) IgG de camélido; y (ix) IgNAR. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes distintos, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se formen en forma de una proteína de una cadena en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Estos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que entren dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica y los fragmentos se analizan según su utilidad del mismo modo que si fueran anticuerpos intactos.

Además, se contempla que un fragmento de unión a antígeno puede estar englobado en un mimético de anticuerpo. La expresión "mimético de anticuerpo" o "mimético", como se usa en el presente documento, quiere decir una proteína que exhibe una unión similar a un anticuerpo pero es un anticuerpo alternativo más pequeño o una proteína que no es un anticuerpo. Dicho mimético de anticuerpo puede estar comprendido en un armazón. El término "armazón" se refiere a una plataforma polipeptídica para la ingeniería de productos nuevos con funciones y características diseñadas a medida.

Como se usa en el presente documento, los términos "que inhibe la unión" y "bloquea la unión" (p. ej., en referencia a la inhibición/bloqueo de la unión del ligando de TFPI al TFPI) se usan de forma intercambiable y abarcan la inhibición o bloqueo total y parcial. También se pretende que inhibición y bloqueo incluyan cualquier disminución mensurable en la afinidad de unión del TFPI a un sustrato fisiológico cuando entra en contacto con un anticuerpo anti-TFPI en comparación con el TFPI que no está en contacto con un anticuerpo anti-TFPI, por ejemplo el bloqueo de la interacción del TFPI con el factor Xa o el bloqueo de la interacción de un complejo TFPI-factor Xa con un factor tisular humano, el factor VIIa o el complejo factor tisular/factor VIIa en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión sencilla por un epítipo concreto. De acuerdo con esto, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina germinal

humana (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específicas e sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*).

Con un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente memoria, se pretende hacer referencia a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une al TFPI está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen a antígenos distintos al TFPI). Un anticuerpo aislado que se une a un epítipo, isoforma o variante de TFPI humano puede, no obstante, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras especies (p. ej., homólogos de especies del TFPI). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

Como se usa en la presente memoria, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente 10^5 M^{-1} y se une al antígeno predeterminado con una afinidad superior, por ejemplo al menos dos veces mayor, que su afinidad de unión a un antígeno irrelevante (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico de un antígeno" se usan de forma intercambiable en la presente memoria con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno."

Como se usa en la presente memoria, el término "afinidad alta" para un anticuerpo IgG se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , en algunas formas de realización de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} , en algunas formas de realización de al menos aproximadamente 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o mayor, por ejemplo de hasta 10^{13} M^{-1} o mayor. No obstante, unión de "afinidad elevada" puede variar para otros isotipos del anticuerpo. Por ejemplo, unión de "alta afinidad" por un isotipo de IgM se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (p. ej., IgM o IgG1) codificado en los genes de la región constante de la cadena pesada.

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

pesada y ligera.

Como se usa en la presente memoria, "sustituciones conservadoras" se refiere a modificaciones de un polipéptido que implican la sustitución de uno o más aminoácidos para aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares que no tienen como resultado la pérdida de una función biológica o bioquímica del polipéptido. Una "*sustitución conservadora de aminoácido*" es una en la que el residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta—ramificadas (p. ej., trombina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Se cree que los anticuerpos de la presente invención pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras y seguir conservando su actividad.

Para ácidos nucleicos y polipéptidos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos, o sus secuencias designadas, cuando se alinean y comparan óptimamente, son idénticas, con

las adecuadas inserciones o deleciones de nucleótidos o de aminoácidos, en al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos o aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente del 85%, preferentemente aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, o 95%, más preferentemente al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, o 99,5% de los nucleótidos o aminoácidos. Como alternativa, existe una homología sustancial para los ácidos nucleicos cuando los segmentos hibridan en condiciones de hibridación selectiva con la hebra complementaria. La invención incluye secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de polipéptidos que tienen homología sustancial con las secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de polipéptidos específicas citadas en la presente memoria.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $\text{n}^\circ \text{ de posiciones idénticas} / \text{n}^\circ \text{ total de posiciones por } 100$), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se han de introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede conseguir usando un algoritmo matemático, tal como, sin limitaciones, el módulo AlignX™ de Vector NTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Para el AlignX™, los parámetros por defecto de la alineación múltiple son: penalización por abertura de huecos: 10; penalización por extensión huecos:

0,05; intervalo de penalización por separación de huecos: 8; % de identidad para retraso de la alineación: 40. (otros detalles se pueden encontrar en [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEACommunities/ Vector-NTI-Community/ Sequence -analysis-and-data-management- softwarefor- PC s/A1ignX-Module-for- Vector-NTI-Advance.reg.us .html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEACommunities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-softwarefor-PCs/A1ignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html)).

Otro procedimiento para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencias sujeto, también denominado alineación de la secuencia global, se puede determinar usando el programa CLUSTALW (Thompson et al., Nucleic Acids Research, 1994, 2(22): 4673-4680), que se basa en el algoritmo de Higgins et al., (Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), 1992, 8(2): 189-191). En una alineación de secuencias, las secuencias problema y sujeto son ambas secuencias de ADN. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación CLUSTALW de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad a través de alineaciones pareadas son: Matriz = IUB, k-tuple = 1, Número de diagonales superiores = 5, Penalización por hueco = 3, Penalización por abertura de hueco = 10, Penalización por extensión de hueco = 0,1. Para alineaciones múltiples se prefieren los siguientes parámetros CLUSTALW: Penalización por abertura de hueco= 10, parámetro por extensión de hueco = 0,05; Intervalo de por Penalización por separación de hueco = 8;

%Identidad para retraso de alineación= 40.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o se "convierte en sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares con los que normalmente está asociado en el entorno natural. Para aislar un ácido nucleico se puede usar técnicas estándar tales como las siguientes: tratamiento alcalino/SDSA, bandas con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica.

Anticuerpos monoclonales optimizados por altas afinidades y actividad funcional

En un estudio previo se identificaron varios anticuerpos anti-TFPI y se han descrito en la solicitud de PCT N° PCT/US2009/052702 presentada el 4 de agosto de 2009, incorporada en el presente documento por referencia para todos los efectos. Estos anticuerpos anti-TFPI se pueden optimizar adicionalmente mediante, por ejemplo, mejora de su afinidad y bloqueando la actividad al TFPI. Dicha optimización se puede realizar, por ejemplo, usando mutagénesis de saturación de sitio de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) o residuos cercanos a las CDR, es decir aproximadamente 3 o 4 residuos adyacentes a las CDR, de los anticuerpos.

También se proporcionan anticuerpos monoclonales que tienen mayor afinidad por el TFPI o afinidad alta. En algunas realizaciones, los anticuerpos

anti-TFPI tienen una afinidad de unión de al menos 10^7 M^{-1} , en algunas realizaciones de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} , en algunas realizaciones de al menos aproximadamente 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o mayor, por ejemplo de hasta 10^{13} M^{-1} o mayor.

La mutagénesis de saturación de sitio en y adyacente a las CDR de dos anticuerpos parentales anti-TFPI, designados en el presente documento 2A8 y 4B7, se usó para optimizar los anticuerpos por afinidad y actividad funcional. También se contempla que la misma optimización se puede realizar en cualquiera de los anticuerpos descritos en el documento PCT/US2009/052702 anterior,

En algunas realizaciones, la mutagénesis de saturación de sitio de las CDR se puede realizar en los anticuerpos anti-TFPI. Para 2A8, las CDR de la cadena pesada mostradas en la SEC ID N° 1 corresponden a los residuos FTFRSYGMS (residuos 27 a 35), SIRGSSSSTYYADSVKG (residuos 50 a 66) y KYRYWFDY (residuos 99 a 106). Para la cadena ligera de 2A8 mostrada en la SEC ID N° 2, las CDR corresponden a los residuos SGDNLRNYYAH (residuos 23 a 33), YYDNNRPS (residuos 48 a 55) y QSWDDGVPV (residuos 88 a 96). Para 4B7, las CDR de la cadena pesada mostradas en la SEC ID N° 3 corresponden a los residuos DSVSSNSAAWS (residuos 27 a 37), IYKRSKWYNDYAVSVKS (residuos 52 a 70) y WHSDKHWGFDY (residuos 102 a 112). Para la cadena ligera de 4B7 mostrada en la SEC ID N° 4, las CDR corresponden a los residuos RSSQSLVFSDGNTYLN (residuos 24 a 39),

KGSNRAS (residuos 55 a 61) y QQYDSYPL (residuos 94 a 102) de la SEC ID N° 4. Se puede realizar una modificación en cualquiera de las seis CDR individualmente o se pueden realizar combinaciones de modificaciones. Además, se pueden realizar dos o mas modificaciones en una única CDR. En otras realizaciones también se pueden introducir modificaciones en las proximidades de las CDR, por ejemplo de aproximadamente 3 o 4 residuos en cualquier lado de cada CDR.

Brevemente, se introdujeron una y/o múltiples modificaciones de aminoácidos y se analizaron para optimizar, por ejemplo mejorar la afinidad, los anticuerpos parentales 2A8 y 4B7. En primer lugar, se introdujeron modificaciones de un aminoácido en las seis CDR o adyacentes a las CDR de cada anticuerpo, seguido por el análisis de las propiedades de unión al TFPI. Las modificaciones que aumentan la señal de unión a TFPI se seleccionaron para la combinación con una o más modificaciones y se analizaron para el posterior incremento de la señal de unión. Tras cada análisis se usaron las variantes de anticuerpo seleccionadas para medir su afinidad por TFPI y la actividad en el bloqueo de la actividad del TFPI y acortamiento del tiempo de coagulación. Por tanto, en algunas realizaciones se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano que tiene un incremento de la afinidad por TFPI en comparación con los anticuerpos parentales no modificados. Además, en algunas realizaciones se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía

del factor tisular humano que tiene un incremento de la actividad de bloqueo por TFPI en comparación con los anticuerpos parentales no modificados. En algunas realizaciones se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano que tiene un acortamiento del tiempo de coagulación en comparación con los anticuerpos parentales no modificados.

En algunas realizaciones se introdujeron modificaciones de aminoácido adicionales para reducir la divergencia con respecto a la secuencia de la línea germinal. En otras realizaciones, se introdujeron modificaciones de aminoácido para facilitar la producción de anticuerpos para los procesos de producción a gran escala.

El anticuerpo puede ser específico de especie o puede reaccionar de forma cruzada con múltiples especies. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede reaccionar de forma específica o reaccionar de forma cruzada con el TFPI de ser humano, ratón, rata, conejo, cobaya, mono, cerdo, perro, gato u otra especie de mamífero.

El anticuerpo puede ser de cualquiera de varias clases de anticuerpos, tales como, sin limitaciones, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, una IgA secretora e IgD, e IgE.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado frente al inhibidor de la vía del factor tisular humano.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado frente al dominio 2 de Kunitz del inhibidor de la vía del factor tisular humano.

Variantes 2A8

De acuerdo con esto, en algunas realizaciones se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos comprende una o más modificaciones de aminoácido. En algunas realizaciones, la modificación de la cadena pesada de 2A8 es una sustitución, una inserción o una delección.

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

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

sustituciones seleccionadas de Q1E, R30S, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I, M34K, S35L, S35D, S50A, I51D, I51E, R52S, S54F, S54D, S55A, S55G, S55R, S56G, K99V, K99L y F104Y.

En algunas realizaciones, la cadena pesada de 2A8 tiene las sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 1: S31V+I51D+S54F+K99V; G33P+S35D+S54F+K99L; S35D+I51D+S55R+K99V; S35L+S54F+K99V; S31V+G33P+S35D; S35D+I51D+K99L; S31V+I51D+S55R+K99L; S31V+S35D+I51D+K99V; G33P+I51D+S54F; I51D+S54F+K99L; S35D+K99L; S31V+G33P+I51D+S54F+K99V; S35D+I51E+S55R+K99L; S31V+K99V; S31V+I51E+S55R+K99V; S35D+S55R+K99L; S31V+S54F+K99L; S31V+I51D+S55R+K99V; S31V+S35D+S55R; S31V+S35D; S31V+I51D+S55R; S35D+S54F+S55R+K99L; S31V+S35D+S54F S31V+S35L+I51D+S54F+K99V; y S31V+S35L+I51E+S54F+K99V.

En algunas realizaciones, la cadena pesada de 2A8 tiene las sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 1: G33A+S35D+S55R+K99L; G33P+I51D+S54F; G33P+S35D+S54F+K99L; I51D+S54F+K99L; M34I+S35D+S55R+K99L; M34K+S35D+S55R+K99L; Q1E+R30S+S35D+S55G+S56G+K99L; Q1E+R30S+S35D+S55R+S56G+K99L; Q1E+S31V+S50A+I51D+S55R+S56G+K99V; Q1E+S35D+S55R+K99L; R30S+S31V+I51D+S55R+K99V; R30S+S35D+S55R+K99L; S31V+G33A+I51D+S55R+K99V; S31V+G33P+I51D+S54F+K99V;

S31V+G33P+S35D; S31V+I51D+R52S+S55R+K99V; S31V+I51D+S54F+K99V; S31V+I51D+S55R; S31V+I51D+S55R+K99L; S31V+I51D+S55R+K99V; S31V+I51D+S55R+S56G+K99V; S31V+I51E+S55R+K99V; S31V+K99V; S31V+S35D; S31V+S35D+I51D+K99V; S31V+S35D+S54F; S31V+S35D+S55R; S31V+S35L+I51D+S54F+K99V; S31V+S35L+I51E+S54F+K99V; S31V+S50A+I51D+S55R+K99V; S31V+S54F+K99L; S35D+I51D+K99L; S35D+I51D+S55R+K99V; S35D+I51E+S55R+K99L; S35D+K99L; S35D+R52S+K99L; S35D+R52S+S55R+K99L; S35D+S50A+K99L; S35D+S50A+S55R+K99L; S35D+S54F+S55R+K99L; S35D+S55G+K99L; S35D+S55R+K99L; S35D+S55R+S56G+K99L; S35D+S56G+K99L; y S35L+S54F+K99V.

En algunas realizaciones, la cadena pesada de 2A8 tiene una o más deleciones. En algunas realizaciones, las deleciones se localizan en las CDR de la cadena pesada de 2A8. En otras realizaciones, las deleciones se localizan fuera de las CDR de la cadena pesada de 2A8. En otras realizaciones, por ejemplo, la deleción está en una posición seleccionada I51, S56 y S57.

Además, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, en el que dicha secuencia de aminoácidos comprende una o más modificaciones de aminoácido. En algunas realizaciones, la modificación es una sustitución, una inserción o una deleción.

En algunas realizaciones, las sustituciones se localizan en las CDR de la cadena ligera de 2A8. En otras realizaciones, las sustituciones se localizan fuera de las CDR de la cadena ligera de 2A8.

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

En algunas realizaciones, la cadena ligera de 2A8 tiene las sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 2: Y48F+N51V; Y48F+N52G; Y48F+D91K; Y48F+D91L+V96W; Y48F+D91W; Y48F+N52G+D91L+V96W; Y48F+N51V+V96W; D91L+V96W; Y48F+N51V+D91W; Y48F+N51V+D91L+V96W; N51V+D91W; Y48F+N51V+G56D+V96W; Y48F+N51V+D91L; y N51V+D91K.

En algunas realizaciones, la cadena ligera de 2A8 tiene las sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 2: A13S+Y48F+N51V+D91W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+D91W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+Y49R+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+D91W; D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T; D1S+Y48F+N51V+D91W; D91L+V96W; H33Y+Y48F+N51V+D91W; I2Y+Y48F+N51V+D91W; N26A+Y48F+N51V+D91W; N29K+Y48F+N51V+D91W; N51V+D91K; N51V+D91W; R28P+Y48F+N51V+D91W; S21T+Y48F+N51V+D91W; Y48F+D91K; Y48F+D91L+D92S+V96W; Y48F+D91L+G93S+V96W; Y48F+D91L+P95V+V96W; Y48F+D91L+V94T+V96W; Y48F+D91L+V96W; Y48F+D91W; Y48F+N51S+D91L+V96W; Y48F+N51V; Y48F+N51V+D91L; Y48F+N51V+D91L+V96W; Y48F+N51V+D91W; Y48F+N51V+D91W+D92S; Y48F+N51V+D91W+G93S; Y48F+N51V+D91W+P95V; Y48F+N51V+D91W+V94T; Y48F+N51V+E80M+D91W; Y48F+N51V+G56D+V96W; Y48F+N51V+S89A+D91W; Y48F+N51V+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T+P95A; Y48F+N51V+V96W; Y48F+N52G; Y48F+N52G+D91L+V96W; y Y48F+S89A+D91L+V96W.

También se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al

inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende:

a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de modificaciones que se pueden realizar se proporcionan anteriormente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N° 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N° 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N° 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al

inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 5; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 6; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 7; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 8; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 15. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 9; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 16. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular

humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 10; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 17. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 11; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 18.

Variantes 4B7

También se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3, que comprende una o más modificaciones de aminoácido. En algunas realizaciones, la modificación de la cadena pesada de 4B7 es una sustitución, una inserción o una delección.

En algunas realizaciones, las sustituciones se localizan en las CDR de la cadena pesada de 4B7. En otras realizaciones, las sustituciones se localizan fuera de las CDR de la cadena pesada de 4B7.

En algunas realizaciones, la sustitución de la cadena pesada de 4B7 está en una posición seleccionada de S30, N32, S57, K58, N61, D62, H103, H107, G109 y Y112. En algunas realizaciones, la sustitución de la cadena pesada de 4B7 también puede incluir una posición seleccionada de Q1, S37,

G44, I53 y K55. Por ejemplo, la sustitución se puede seleccionar de Q1E, S30R, N32D, N32E, S33G, S37N, G44S, I53T, K55Y, S57K, S57R, K58M, N61G, N61T, D62I, D62R, D62Q, D62L, D62S, D62V, D62N, D62K, H103D, H103G, H107M, G109A y Y112D. Además, en algunas realizaciones el anticuerpo puede comprender dos o más sustituciones seleccionadas de Q1E, S30R, N32D, N32E, S33G, S37N, G44S, I53T, K55Y, S57K, S57R, K58M, N61G, N61T, D62I, D62R, D62Q, D62L, D62S, D62V, D62N, D62K, H103D, H103G, H107M, G109A y Y112D.

En algunas realizaciones, la cadena pesada de 4B7 tiene las sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 3:

N32D+D62Q+H107M+Y112D; N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D;
 N32D+D62R+H107M+Y112D; N32D+D62R+Y112D; D62Q+Y112D;
 D62R+Y112D; D62R+H107M+Y112D; N32D+D62Q+Y112D;
 N32D+D62R+H107M; N32D+D62S+H107M+Y112D; D62Q+H107M+Y112D;
 N32D+D62R+H103D; D62S+H107M+Y112D; S30R+S57K; N61G+D62V; y
 K58M+D62N. En algunas realizaciones, la cadena pesada de 4B7 tiene las
 sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 3: D62Q+H107M+Y112D;
 D62Q+Y112D; D62R+H107M+Y112D; D62R+Y112D; D62S+H107M+Y112D;
 N32D+D62K+Y112D; N32D+D62Q+H107M+Y112D; N32D+D62Q+Y112D;
 N32D+D62R+H103D; N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D;
 N32D+D62R+H107M; N32D+D62R+H107M+Y112D; N32D+D62R+Y112D;
 N32D+D62S+H107M+Y112D; N32D+G44S+D62R+Y112D;

N32D+I53T+D62Q+Y112D; N32D+I53T+D62R+Y112D; N32D+K55Y+D62Q+Y112D; N32D+K55Y+D62R+Y112D; N32D+S37N+D62R+Y112D; Q1E+N32D+D62R+Y112D; Q1E+N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D; N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D; S30R+S57K; N61G+D62V; y K58M+D62N.

Adicionalmente se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4, que comprende una o más modificaciones de aminoácido. En algunas realizaciones, la modificación de la cadena ligera de 4B7 se selecciona de una sustitución, una inserción o una delección.

En algunas realizaciones, las sustituciones se localizan en las CDR de la cadena ligera de 4B7. En otras realizaciones, las sustituciones se localizan fuera de las CDR de la cadena ligera de 4B7.

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

comprender dos o más sustituciones seleccionados de M4I, M4L, V30L, F31I, F31M, F31Y, F31H, S32L, S32R, S32Y, D33F, D33R, N35I, N35L, N35T, N35V, T36N, Y37F, N39D, L42Q, K44R, Q50R, L51R, Y54F, K55L, G56D, G56A, G56V, S57Y, A60D, S61C, D97M, D97T y S98H.

En algunas realizaciones, la cadena ligera de 4B7 tiene las sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 4: S32R+N35T; S32R+N35T+D97T; S32R+D33F+N35I; S32R+D33F+N35I+D97T; S32R+D33F+N35T; S32R+D33F; S32R+D33R+N35I; S32R+D33R+N35I+D97T; S32R+D33R; S32R+D33R+N35T; N35T+D97T; D33F+N35I; D33F+N35I+D97T; D33F+N35T+Y37F; D33R+N35I; D33R+N35I+D97T; D33R+N35T; F31I+S32R+N35I+D97T; F31I+S32R+D33F+N35I+D97T; F31I+S32R+D33F+N35T; F31I+S32R+D33R+N35I+D97T; F31I+N35I; F31I+D33F+N35I; F31I+D33F+N35I+D97T; F31I+D33R+N35I; F31I+D33R; F31M+S32L+D33R+N35I+D97T; F31M+S32R+D33F+N35I; F31M+S32R+D33F+N35I+D97T; F31M+S32R+D33F+D97T; F31M+S32R+D33R+N35I; F31M+S32R+D33R+N35I+D97T; F31M+S32R+D33R; F31M+S32R+D33R+N35T; F31M+D33F+N35I; F31M+D33F; F31M+D33F+N35T; F31M+D33R+N35I; F31M+D33R; S32R+N35I; F31M+D33F+N35T+Y37F; N35V+G56D; N35L+G56A; y D33F+Y54F.

En algunas realizaciones, la cadena ligera de 4B7 tiene las sustituciones siguientes con respecto a la SEC ID N° 4: D33F+N35I; D33F+N35I+D97T;

D33F+N35T+Y37F; D33R+N35I; D33R+N35I+D97T; D33R+N35T;
 F31H+S32R+D33F+N35I+D97T; F31I+D33F+N35I; F31I+D33F+N35I+D97T;
 F31I+D33F+N35I+K44R; F31I+D33F+N35I+L42Q; F31I+D33F+N35I+S98H;
 F31I+D33F+N35I+T36N; F31I+D33R; F31I+D33R+N35I; F31I+N35I;
 F31I+S32R+D33F+N35I+D97T; F31I+S32R+D33F+N35T;
 F31I+S32R+D33R+N35I+D97T; F31I+S32R+N35I+D97T; F31M+D33F;
 F31M+D33F+N35I; F31M+D33F+N35T; F31M+D33F+N35T+Y37F;
 F31M+D33R; F31M+D33R+N35I; F31M+S32L+D33R+N35I+D97T;
 F31M+S32R+D33F+D97T; F31M+S32R+D33F+N35I;
 F31M+S32R+D33F+N35I+D97T; F31M+S32R+D33R;
 F31M+S32R+D33R+N35I; F31M+S32R+D33R+N35I+D97T;
 F31M+S32R+D33R+N35T; F31Y+S32R+D33F+N35I+D97T;
 M4I+S32R+D33F+N35I+D97T; M4L+S32R+D33F+N35I+D97T; N35T+D97T;
 S32R+D33F; S32R+D33F+N35I; S32R+D33F+N35I+A60D+D97T;
 S32R+D33F+N35I+D97T; S32R+D33F+N35I+D97T+S98H;
 S32R+D33F+N35I+G56V+D97T; S32R+D33F+N35I+K44R+D97T;
 S32R+D33F+N35I+K55L+D97T; S32R+D33F+N35I+L42Q+D97T;
 S32R+D33F+N35I+L51R+D97T; S32R+D33F+N35I+N39D+D97T;
 S32R+D33F+N35I+Q50R+D97T; S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;
 S32R+D33F+N35T; S32R+D33R; S32R+D33R+N35I;
 S32R+D33R+N35I+D97T; S32R+D33R+N35T; S32R+N35I; S32R+N35T;
 S32R+N35T+D97T; V30L+F31I+D33F+N35I; V30L+S32R+D33F+N35I+D97T;

V30L+S32R+D33F+N35I+T36N+D97T; V30L+S32R+N35I+T36N; N35V+G56D; N35L+G56A; y D33F+Y54F.

También se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende:

a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de modificaciones que se pueden realizar se proporcionan anteriormente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N° 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N° 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34.

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

SEC ID N° 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N° 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 19; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 27. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 20; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 28. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 21; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 29. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 22; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 30. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de

aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 23; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 31. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 24; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 32. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 25; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 33. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 26; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 34.

Combinaciones de variantes 2A8/4B7

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

De acuerdo con esto, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende: a) una cadena pesada de 2A8 que comprende una

secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera de 4B7 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de modificaciones que se pueden realizar se proporcionan anteriormente.

También se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende: a) una cadena pesada de 4B7 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido; y b) una cadena ligera de 2A8 que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de modificaciones que se pueden realizar se proporcionan anteriormente.

En algunas realizaciones se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende: a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N° 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26; y b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC

ID N° 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34.

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

También se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos con anterioridad.

Por tanto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de dichas modificaciones se han descrito en lo que antecede.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de dichas modificaciones se han descrito en lo que antecede.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3, en el que dicha

secuencia de aminoácidos de la cadena pesada comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de dichas modificaciones se han descrito en lo que antecede.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4, en el que dicha secuencia de aminoácidos de la cadena ligera comprende una o más modificaciones de aminoácido. Ejemplos de dichas modificaciones se han descrito en lo que antecede.

Adicionalmente, también se proporcionan vectores que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos con anterioridad y células huésped que comprenden dichos vectores.

Procedimientos para preparar anticuerpos frente a TFPI

El anticuerpo monoclonal se puede producir de forma recombinante expresando una secuencia de nucleótidos que codifica las regiones variables del anticuerpo monoclonal de acuerdo con las formas de realización de la invención en una célula huésped. Con la ayuda de un vector de expresión, un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos se puede transfeccionar y expresar en una célula huésped adecuada para la producción. De acuerdo con esto, también se proporciona un procedimiento para producir

un anticuerpo monoclonal que se une al TFPI humano, que comprende:

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

(b) cultivar la célula huésped para expresar el anticuerpo monoclonal en la célula huésped y, opcionalmente,

(c) aislar y purificar el anticuerpo monoclonal producido, en el que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal de la presente invención.

En un ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, obtenidos mediante técnicas de biología molecular estándar se insertan en vectores de expresión de modo que los genes están operablemente unidos a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "unido de forma operativa" quiere decir que un gen del anticuerpo está ligado en un vector tal que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven a la función prevista de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se escogen de modo que sean compatibles con la célula huésped usada para la expresión. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores distintos o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándar (p. ej., ligando sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y en el vector, o ligando los extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden usar para crear genes de los anticuerpos de longitud completa de un isotipo de anticuerpo insertándolas en vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de la cadena pesada y constantes de la cadena ligera del isotipo deseado, de modo que el segmento V_H está operativamente unido al(los) segmento(s) C_H dentro del vector y el segmento V_L está unido operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente, o como alternativa, el vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté unido dentro del marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulínica).

Además de los genes que codifican la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. Con la expresión "secuencia reguladora" se

pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Ejemplos de secuencias reguladoras para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión proteica en células de mamífero, tal como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus 40 de simios (SV40), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), y polioma. Como alternativa, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β -globina.

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por

ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel y col.) Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula huésped en la que el vector se ha introducido. Ejemplos de genes marcadores seleccionables preferidos se incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped dhfr- con selección con metotrexato/amplificación) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el(los)vector(es) de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada se transfeccionan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" están destinadas a abarcar una amplia variedad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección en DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped tanto procariotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente en células huésped de mamífero, es la más preferida porque es más probable que dichas células eucariotas, y en particular las células de mamífero, se ensamblen y secreten un anticuerpo inmunológicamente activo y adecuadamente plegado.

Ejemplos de células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células

CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS, células HKB y células SP2. Cuando los vectores de expresión que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando procedimientos de purificación proteica estándar, tales como ultrafiltración, cromatografía de exclusión por tamaño, intercambio de cromatografía y centrifugación.

Uso de secuencias parciales de anticuerpos para expresar anticuerpos intactos

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se localizan en las seis CDR de la cadena pesada y la ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que simulen las propiedades de

los anticuerpos específicos naturales construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias CDR del anticuerpo natural específico introducido en las secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. y col., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. y col., 1986, Nature 321:522-525; y Queen, C. y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033). Dichas secuencias estructurales se puede obtener de bases de datos de ADN públicos que incluye las secuencias génicas de anticuerpo germinal. Estas secuencias germinales diferirán de las secuencias del gen del anticuerpo maduro porque no incluyen genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante la unión V(D)J durante la maduración de las células B. No es necesario obtener toda la secuencia de ADN de un anticuerpo concreto para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). La secuencia parcial de las cadenas pesadas y ligeras que abarcan las regiones CDR normalmente es suficiente para este fin. La secuencia parcial se usa para determinar qué segmentos génicos germinales variables y de unión contribuyeron a los genes variables del anticuerpo recombinado. La secuencia germinal se usa después para llenar las porciones perdidas de las regiones variables. Las secuencias líder de las cadenas pesada y ligera se escinden durante la maduración de las proteínas y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Por esta razón es necesario usar la correspondiente secuencia líder germinal para las

construcciones de expresión. Para añadir secuencias perdidas, las secuencias de ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligadura o amplificación por PCR. Como alternativa, toda la región variable se puede sintetizar como un grupo de oligonucleótidos cortos, solapantes, y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable enteramente sintética. Este procedimiento tiene ciertas ventajas, tales como la eliminación o inclusión de sitios de restricción concretos, u optimización de codones concretos.

Las secuencias nucleotídicas de los transcritos de las cadenas pesada y ligera se usan para diseñar un grupo solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con idénticas capacidades de codificación de aminoácidos que las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de las cadenas pesada y ligera pueden diferir de las secuencias naturales. Por ejemplo: Tiras de bases nucleotídicas repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; los sitios óptimos de inicio de la traducción se incorporan de acuerdo con las normas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); y los sitios de restricción se introducen cadena arriba o cadena abajo de los sitios de inicio de la traducción.

Para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, las secuencias codificadoras optimizadas, y las correspondientes no codificadora, se rompen en 30-50 secciones nucleotídicas en aproximadamente el centro del oligonucleótidos no codificador correspondiente, Por tanto, para cada cadena,

los oligonucleótidos se pueden ensamblar en grupos de doble hebra solapantes que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Los grupos se usan después como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Normalmente, un único grupo de oligonucleótidos de la región variable se romperá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. A continuación, estos productos solapantes se combinan mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de la cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que se puedan clonar fácilmente en las construcciones del vector de expresión.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera reconstruidas se combinan después con secuencias clonadas promotoras, de inicio de la traducción, región constante, región 3' no traducida, de poliadenilación y de terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de las cadenas pesada y ligera se pueden combinar en un único vector, co-transfeccionar, transfeccionar en serie o transfeccionar por separado en células huésped que se condensan después para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas.

Por tanto, en otro aspecto, las características estructurales de un anticuerpo anti-TFPI humano, se usan para crear anticuerpos anti-TFPI humanos estructuralmente relacionados que conservan la función de la unión al

TFPI. Más específicamente, una o más CDR de las regiones de cadena pesada y ligera identificadas específicamente de los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden combinar de forma recombinante con regiones estructurales y CDR humanas conocidas para crear anticuerpos anti-TFPI humanos sometidos a ingeniería recombinante de la invención.

Composiciones Farmacéuticas

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI y un transportador farmacéuticamente aceptable. "Transportador farmacéuticamente aceptable" es una sustancia que se puede añadir al ingrediente activo para ayudar a formular o estabilizar la preparación y que no produce efectos toxicológicos adversos significativos en el paciente. Ejemplos de dichos transportadores son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen agua, azúcares tales como maltosa o sacarosa, albúmina, sales tales como cloruro sódico etc. Otros transportadores se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal anti-TFPI.

Transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien

conocido en la técnica. Preferentemente, la composición se formula para inyección parenteral. La composición se puede formular en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la elevada concentración del fármaco. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. En algunos casos, incluirá agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización, que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar.

Usos farmacéuticos

El anticuerpo monoclonal puede usarse para fines terapéuticos para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos de la coagulación. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales en las formas de realización descritas con anterioridad se pueden usar para bloquear la interacción de TFPI con FXa o para prevenir la inhibición dependiente de TFPI de la actividad de TF/FVIIa. De forma adicional, el anticuerpo monoclonal puede usarse también para restablecer una generación dirigida por TF/FVIIa de Fxa para sortear la insuficiencia de la amplificación de FXa dependiente de FVIII o FIX.

Los anticuerpos monoclonales tienen uso terapéutico en el tratamiento de trastornos de hemostasia tales como trombocitopenia, trastornos de las plaquetas y trastornos de hemorragia (p. ej., hemofilia A, hemofilia B y hemofilia C). Dichos trastornos se pueden tratar administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-TFPI a un paciente que lo necesite. Los anticuerpos monoclonales también tienen uso terapéutico en el tratamiento de hemorragias no controladas en indicaciones tales como traumatismos e ictus hemorrágico. Por tanto, también se proporciona un procedimiento para acortar el tiempo de sangrado que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI de la invención a un paciente que lo necesite.

Los anticuerpos se pueden usar en forma de monoterapia o en combinación con otras terapias para abordar un trastorno hemostático. Por ejemplo, se cree que la co-administración de uno o más anticuerpos de la

invención con un factor de coagulación tal como el factor VIIa, el factor VIII o el factor IX es útil para tratar la hemofilia. En una forma de realización, se proporciona un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos de la coagulación, que comprende administrar (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano y (b) una segunda cantidad de factor VIII o de factor I, en el que dichas cantidades primera y segunda juntas son eficaces para tratar dichas deficiencias o defectos. En otra forma de realización, se proporciona un procedimiento para tratar deficiencias o defectos genéticos y adquiridos de la coagulación, que comprende administrar (a) una primera cantidad de un anticuerpo monoclonal que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano y (b) una segunda cantidad de factor VIII o de factor I, en el que dichas cantidades primera y segunda juntas son eficaces para tratar dichas deficiencias o defectos, y, además, en el que el factor VII no se co-administra. La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación de un anticuerpo monoclonal de la invención y el factor VIII o factor IX, en la que la composición no contiene factor VII. "Factor VII" incluye el factor VII y el factor VIIa. Es probable que estas terapias de combinación reduzcan la frecuencia de infusión necesaria del factor de coagulación. Por co-administración o terapia de combinación se quiere decir administración de los dos fármacos terapéuticos, cada uno formulado por separado o juntos en una composición y, cuando se

formulan por separado, se administran aproximadamente a la vez o en momentos diferentes, pero en el mismo periodo terapéutico-

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

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral a los sujetos que sufran hemofilia A o B, a una dosificación y frecuencia que puede variar con la gravedad del episodio de sangrado o, en el caso de la terapia profiláctica, puede variar con la gravedad de la deficiencia de la coagulación del paciente.

Las composiciones se pueden administrar a los pacientes que las necesiten en forma de bolo o de infusión continua. Por ejemplo, una administración en bolo de un anticuerpo de la invención presente en forma de fragmento Fab puede estar en una cantidad de 0,0025 a 100 mg/kg de peso corporal, de 0,025 a 0,25 mg/kg, de 0,010 a 0,10 mg/kg o de 0,10-0,50 mg/kg. Para la infusión continua, un anticuerpo de la invención presente en forma de fragmento Fab se puede administrar a 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal/minuto, de 0,0125 a 1,25 mg/kg/min, de 0,010 a 0,75 mg/kg/min, de 0,010 a 1,0 mg/kg/min o de 0,10-0,50 mg/kg/min. Durante un periodo de 1-24 horas, 1-12 horas, 2-12 horas, 6-12 horas, 2-8 horas o 1-2 horas. Para la

administración de un anticuerpo de la invención presente en forma de anticuerpo de longitud completa (con las regiones constantes completas), las cantidades de dosificación pueden ser de aproximadamente 1-10 mg/kg de peso corporal, 2-8 mg/kg, o 5-6 mg/kg. Dichos anticuerpos de longitud completa se administrarían, normalmente, mediante infusión ampliada a un periodo desde treinta minutos a tres horas. La frecuencia de la administración dependería de la gravedad de la afección. La frecuencia podría variar desde tres veces a la semana a una vez cada dos semanas a seis semanas.

De forma adicional, las composiciones se pueden administrar a los pacientes mediante inyección subcutánea. Por ejemplo, una dosis de 10 a 100 mg de anticuerpo anti-TFPI se puede administrar a los pacientes mediante inyección subcutánea semanalmente, cada dos semanas o mensualmente,

Como se usa en la presente memoria, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI o de una combinación de dicho anticuerpo y factor VIII o factor IX que es necesaria para aumentar de forma eficaz el tiempo de coagulación in vivo o, de otro modo, producir un beneficio mensurable in vivo en un paciente que lo necesite. La cantidad exacta dependerá de numerosos factores, incluidos, entre otros, los componentes y las características físicas de la composición terapéutica, la población de pacientes a la que está destinado, el modo de administración, las consideraciones de cada paciente individual y similares, y un experto en la técnica puede determinarla con facilidad.

Ejemplos

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

Las cadenas pesada y ligera de los Fab salvajes de 2A8 y 4B7 portadores de una marca c-myc y una marca de hexa-histidina en el extremo C de la cadena pesada se subclonaron en el vector de expresión bacteriano pET28a (Novagen/Merck Chemicals Ltd., Nottingham, Reino Unido) y se transformaron en células Top10F' (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). Como alternativa se pueden usar otros vectores de expresión bacterianos (p.ej., el sistema del vector pQE, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y cepas (p.ej., DH5 α , Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). Se generaron variantes mediante mutagénesis estándar dirigida a sitio con oligonucleótidos y se confirmaron mediante secuenciación del ADN. En particular se modificaron los residuos de aminoácidos dentro de o alrededor de las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas pesada y/o ligera.

Para poder usar anticuerpos salvajes o mutantes como competidores, las colas del epítipo localizadas en el extremo C de la cadena pesada se eliminaron o sustituyeron cuando técnicas estándar basadas en PCR. En concreto, para 4B7, el c-myc-tag se intercambió con una cola epítipo de hemaglutinina (HA) para todas las variantes analizadas. Por el contrario, 4B7 salvaje o variantes usadas como competidores portaban un c-myc-tag. En el caso de 2A8, la cola del epítipo c-myc se sustituyó con una cola de HA o se

55
56

delecionó, lo que tiene como resultado una variante que solo mostraba una cola de epítipo de histidina 6x en su extremo C.

Para la expresión, las variantes se transformaron en la cepa BL21starDE3 de *Escherichia coli* (Invitrogen, C6010-03), se inocularon en un cultivo durante la noche en medio LB que contiene con kanamicina (30 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Los cultivos de expresión se generaron inoculando durante el noche el cultivo a 1:20 en medio LB fresco con kanamicina (30 µg/ml). Tras 6 horas se añadió isopropilo-b-D-1-tiogalactopiranosido 1 mM (Roth, 2316.5) para indicar la expresión de anticuerpos y los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales a 30 °C. Como alternativa, los cultivos durante la noche se inocularon a 1:20 en el medio de autoincubación medio Overnight Express TB (Merck, 71491) y se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

Para cuantificar los niveles de expresión se usó un ELISA. Brevemente, placas MTP (Nunc maxisorp black, 460518) se incubaron con un anticuerpo específico de Fab (Sigma, I5260) diluido en tampón de revestimiento Candor Bioscience GmbH, 121500) a 4°C durante la noche, se lavaron con PBST (solución salina tamponada con fosfato): NaCl 137mM, Merck 1.06404.5000; KCl 2,7mM, Merck 1.04936.1000; Na₂HPO₄ 10mM, Merck 1.06586.2500, KH₂PO₄ 1,8 mM, Merck 1.04871.5000; que contiene Tween 20 Acros Organics, 233360010) al 0,05 %, se bloquearon con 2% de leche en PBST durante 1 hora a 20°C y se lavaron de nuevo. Los cultivos se diluyeron en leche desgrasada al

0,25 % (Fluka analytical, 70166) en PBS y unieron a las placas de MTP durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBST, los anticuerpos capturados se incubaron con un anticuerpo anti-Fab acoplado a HRP (Sigma, A0293) y se detectaron mediante incubación de la placa con sustrato rojo amplex 10 μ M (Invitrogen, A12222) durante de 10 a 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, seguido por medición de la fluorescencia. Los niveles de expresión se normalizaron después de determinar la concentración respecto al anticuerpo purificado salvaje (2A8 o 4B7).

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

Para determinar la actividad de las variantes de anticuerpo mutadas en TFPI humano o de ratón (American Diagnostica, 4900B and R&D Systems, 2975-P1, respectivamente) se usó un formato de ensayo de ELISA de equilibrio o competitivo. Brevemente, las placas MTP (Mesoscale Discovery, L21XA-4 o Nunc maxisorp black, 460518) se recubrieron con 0,04-2 μ g/ml de TFPI humano o de ratón diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de revestimiento (Candor Bioscience GmbH, 121500) respectivamente y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar, las placas se bloquearon con 3% de seroalbúmina bovina (Sigma, A4503) en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente y se repitió la etapa de lavado. Para la unión de los anticuerpos 10-25 μ l de los sobrenadantes de cultivo normalizados a su correspondiente nivel de expresión del anticuerpo (si no ha indicado lo contrario)

se añadieron a las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado con PBST. Las salvajes y variantes unidas se detectaron mediante un anticuerpo de cola de epítipo específico o se incluyó una etapa de competición. Para competición, se añadió competidor 50-300 nM o antígeno libre y se incubó durante 20 minutos a 24 horas a temperatura ambiente. Después de lavar, el resto de las variantes se detectó con un anticuerpo específico de la cola de epítipo acoplado con peroxidasa de rábano (Biomol, anti-c-myc A190-105P para las variantes 2A8 y anti-HA A190-108P para las variantes 4B7) o mediante un anticuerpo anti-myc (Sigma, C3956) o anti-HA (Sigma, H6908) previamente marcado con un reactivo sufo-NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detección electroquimioluminiscente (Mesoscale Discovery, R91AN-1) Para la detección de señal en placas maxisorp se añadió sustrato rojo amplex 10 μ M (Invitrogen, A12222) y se incubó durante de 10 a 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, seguido por medición de fluorescencia. Para la detección en placas MSD y tampón T de lectura MSD se diluyó a 2x en H₂O (Mesoscale Discovery, R92TC-1), se añadió a las placas y la señal de electroquimioluminiscencia se detectó a 620 nm usando Mesoscale Discovery Sector Imager 6000.

Ejemplo 3. Sustituciones de un solo aminoácido o de múltiples

En la Tabla 1 se proporcionan varios ejemplos de sustituciones de un solo aminoácido introducidas en las cadenas pesada o ligera de 2A8. El nivel de expresión de las variantes se analizó por cuádruple en un ELISA de

58
59

cuantificación. Tras la normalización al respectivo nivel de expresión se analizó el rendimiento por cuádruple en el ELISA competitivo en TFPI murino y humano y se determinaron las proporciones entre el variante y el salvaje (wt). Los errores se calcularon mediante propagación de error desde las desviaciones estándar.

Tabla 1. Análisis de sustituciones de un aminoácido en 2A8.

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

89
60

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

En la Tabla 2 se facilitan algunos ejemplos de sustituciones aminoacidicas combinadas dentro de los anticuerpos de TFPI 2A8. Aunque en la Tabla 2 no se proporcionan todas las combinaciones, se contempla que el anticuerpo anti-TFPI puede comprender cualquier combinación de

modificaciones proporcionadas. El nivel de expresión de las variantes se analizó por cuádruple en un ELISA de cuantificación. Si no se indica lo contrario, las variantes se normalizaron con respecto al respectivo nivel de expresión y se analizó el rendimiento por cuádruple en el ELISA competitivo en TFPI murino y humano, seguido del cálculo de las proporciones entre el variante y la referencia (HC_K99L). Los valores están marcados con “#” en caso de que se analice el rendimiento del variante sin normalización previa y las proporciones entre el variante y la referencia se normalizaron con el nivel de expresión dividiendo la señal del ensayo por el nivel de expresión. En los casos en los que se usó una referencia diferente en el ELISA competitivo y las variantes se analizaron sin normalización previa, los valores se marcaron con un “*”. Para estas variantes, el valor indicado en la tabla se calculó multiplicando las proporciones variante/referencia alternativa con la referencia alternativa/HC_K99L. Los errores se calcularon mediante propagación de error desde las desviaciones estándar.

62

Tabla 2. Ejemplo de múltiples sustituciones de un aminoácido en 2A8.

2A8 HC													2A8 LC														hTFPI		mTFPI										
Q1	R30	S31	G33	M34	S35	S50	I51	R52	S54	S55	S56	K99	D1	I2	A13	S21	N26	R28	N29	H33	Y48	Y49	N51	N52	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	P95	V96	variante/HC_K99L	error	variante/HC_K99L	error		
		V					D		F			V									F		V											8,1*	0,4	2,2*	0,4		
			P		D				F			L									F			G										6,2*	1,4	2,3*	0,8		
					D		D			R		V									F		V												8,0*	0,5	2,7*	0,4	
					L				F			V									F								K						5,0*	0,6	3,1*	0,5	
		V	P		D																F								L				W	22,5*	1,6	5,9*	1,3		
					D		D					L									F								W						0,8*	0,1	0,2*	0,0	
		V					D			R		L									F			G					L				W	0,4*	0,1	0,1*	0,0		
		V			D		D					V									F								K						0,6*	0,0	0,1*	0,0	
			P				D		F												F		V										W	0,6	0,2	0,4	0,1		
							D		F			L																	W						6,2	1,6	5,3	1,2	
		V			D				F												F								L					W	5,4	1,6	4,2	1,0	
					D							L																	L					W	7,1	1,9	5,4	1,3	
		V	P				D		F			V									F		V						W						6,6	0,7	5,9	0,9	
					D		E			R		L									F		V						L					W	10,4	1,3	8,0	1,6	
		V										V											V						W						6,7	0,9	5,6	1,0	
		V					E			R		V									F								L					W	9,2	1,0	7,0	1,9	
					D							L									F		V		D									W	18,8	2,1	18,7	2,6	
		V							F			L											V													16,3	1,8	15,7	2,6
		V	P		D																F		V						L						12,2	1,1	11,7	2,2	
					D					R		L									F		V						L					W	17,8	2,1	13,4	5,4	
		V			D					R											F		V						L					W	8,7	0,9	8,2	3,9	
		V			D																F		V													7,5	0,9	7,2	1,9
		V					D			R											F		V						L							8,4	0,9	6,5	1,4
					D				F	R		L																	L					W	14,9	1,6	12,1	4,8	
		V			L		D		F			V											V						K							8,6	1,0	8,2	1,4
		V			L		E		F			V											V						K							4,9	0,6	3,9	0,7
					D							L																								3,9	0,7	4,5	0,7
					D							L									F								L					W	18,8	1,7	18,2	3,4	
		V					D			R		V									F								L					W	16,4	1,5	11,9	4,0	
					D					R		L									F		V						W							19,7	2,2	17,4	3,8
					D					R		L	S								F		V						W							21,9*	5,3	22,0*	8,9

				D				R	L	Y					F	V			W						18,7°	4,2	19,0°	6,8		
				D				R	L		S				F	V			W						20,1°	6,2	19,9°	7,4		
				D				R	L			T			F	V			W						19,5°	4,5	18,8°	6,6		
				D				R	L				A		F	V			W						4,1°	1,1	4,1°	1,5		
				D				R	L					P	F	V			W						22,0°	5,7	23,2°	9,1		
				D				R	L						K	F	V		W						20,0°	5,8	18,9°	7,1		
				D				R	L							Y	F	V		W					14,0°	3,4	11,2°	4,4		
				D				R	L							F	V		M	W					23,1°	5,5	21,2°	7,5		
				D				R	L							F	V			A	W				18,6°	5,0	18,2°	6,8		
				D				R	L							F	V			W	S				23,9°	6,3	22,8°	7,6		
				D				R	L							F	V			W		S			17,0°	4,0	16,5°	5,9		
				D				R	L							F	V			W			T		22,8°	6,4	19,9°	8,0		
				D				R	L							F	V			W			V		15,7°	3,9	13,7°	5,1		
				D				R	L							F	V			A	W	S	S	T	A	10,9°	3,1	9,0°	4,0	
E				D				R	L							F	V			W					20,9°	5,3	20,3°	7,4		
	S			D				R	L							F	V			W					17,9°	4,5	19,1°	6,9		
		A		D				R	L							F	V			W					16,0°	3,6	14,7°	5,2		
			I	D				R	L							F	V			W					19,6°	4,9	18,1°	6,8		
			K	D				R	L							F	V			W					11,2°	2,8	11,6°	4,1		
				D	A			R	L							F	V			W					10,9°	2,8	12,6°	4,4		
				D			S	R	L							F	V			W					10,1°	2,7	7,9°	2,7		
				D				R	G	L						F	V			W					21,4°	5,2	18,7°	7,2		
E	S			D				R	G	L	S	Y	S	T		P	K	F	V		M	A	W	S	S	T	18,3°	4,6	13,3°	4,3
E	S			D				R	G	L								F	V			W			11,9°	2,1	9,3°	2,9		
				D				R		L	S	Y	S	T		P	K	F	V		M	A	W	S	S	T	21,4°	3,6	16,8°	5,8
E	S			D				R	G	L	S	Y	S	T		P		F	V		M	A	W	S	S	T	18,8°	4,4	12,3°	3,5
E	S			D				R	G	L	S	Y	S	T		P	K	F	V		M		W			19,8°	3,3	15,5°	4,8	
E	S			D				R	G	L	S	Y	S	T		P		F	V		M		W			18,7°	3,4	15,1°	4,6	
				D						L								F	S				L		W	19,9°	4,0	20,3°	5,7	
				D						L								F				A	L		W	4,4°	1,3	6,1°	1,7	
				D						L								F					L	S	W	20,7°	4,1	20,5°	6,7	
				D						L								F					L		S	W	14,2°	2,7	15,6°	4,2
				D						L								F					L		T	W	18,6°	4,0	19,3°	5,4
				D						L								F					L		V	W	10,2°	2,1	13,6°	4,6
				D	A					L								F					L		W	4,0°	0,9	4,6°	1,3	
				D			S			L								F					L		W	3,9°	1,2	3,0°	1,0	
				D				G		L								F					L		W	18,1°	4,3	18,2°	5,8	
				D					G	L								F					L		W	17,8°	4,2	16,9°	5,0	
E	S			D				G	G	L								F					L		W	13,6°	2,8	10,6°	3,6	
	S	V			D			R		V								F					L		W	13,5°	2,8	6,5°	3,3	
		V	A			D		R		V								F					L		W	9,0°	2,0	4,7°	2,3	
		V			A	D		R		V								F					L		W	16,6°	3,8	9,3°	4,3	
		V				D	S	R		V								F					L		W	11,7°	2,9	7,9°	4,6	
		V				D		R	G	V								F					L		W	16,2°	3,9	12,1°	6,0	
E		V			A	D		R	G	V								F					L		W	12,1°	2,8	7,7°	3,8	

64

	V			D		R	V	S	Y	S	T		P	K		F	R	S		M	L	S	T	W	2,2*	0,9	2,4*	1,4	
E	V			A	D		R	G	V	S	Y	S	T		P	K		F	S		M	L	S	T	W	11,4*	2,7	7,1*	3,6
E	V			A	D		R	G	V	S	Y	S	T		P	K		F			M	L	S	T	W	9,8*	2,5	5,9*	2,0
	V				D		R		V	S	Y	S	T		P	K		F	S		M	L	S	T	W	19,6*	3,5	21,4*	9,6
	V				D		R		V	S	Y	S	T		P	K		F			M	L	S	T	W	18,0*	4,9	15,4*	7,6

En la Tabla 3 se proporcionan varios ejemplos de sustituciones de un solo aminoácido generadas en las cadenas pesada y ligera de 4B7. El nivel de expresión de las variantes se analizó por cuádruple en un ELISA de cuantificación. Tras la normalización al respectivo nivel de expresión se analizó el rendimiento por cuádruple en el ELISA competitivo en TFPI humano y en el ELISA EN equilibrio EN TFPI murino seguido por determinación de las proporciones entre la variante y la salvaje.

Los errores se calcularon mediante propagación de error desde las desviaciones estándar.

Tabla 3. Análisis de una sustitución o de sustituciones dobles en 4B7.

Variantes 4B7	hTFPI		mTFPI	
	variante/salvaje	error	variante/salvaje	error
HC_N32D	3,8	0,7	6,0	2,9
HC_N32E	3,2	1,0	2,1	0,3
HC_S33G	1,5	0,3	6,5	1,2
HC_S57K	1,7	0,4	6,5	1,1
HC_S57R	2,0	0,4	6,6	1,4
HC_D62I	9,8	1,6	44,4	11,6
HC_D62R	32,3	4,5	230,2	34,1
HC_D62L	6,8	1,2	22,9	6,1
HC_D62Q	20,6	2,8	142,5	28,0
HC_D62S	29,3	4,3	146,5	40,4
HC_H103D	2,4	0,4	12,9	2,0
HC_H103G	1,4	0,3	10,7	2,0
HC_Y112D	2,9	0,6	5,7	1,3

600
65

LC_S32R	4,2	0,7	7,8	1,5
LC_S32Y	2,0	0,4	6,7	1,2
LC_D33F	5,3	1,3	7,0	2,6
LC_D33R	3,6	0,7	7,2	1,9
LC_N35I	3,6	0,7	7,1	1,5
LC_N35L	2,1	1,0	6,0	1,3
LC_N35T	5,4	1,0	3,4	1,1
LC_Y37F	3,6	0,7	1,9	0,6
LC_S57Y	1,6	0,4	2,2	0,4
LC_S61C	3,1	0,5	15,3	4,2
LC_D97M	2,4	0,5	1,3	0,4
LC_D97T	1,8	0,3	5,5	1,6
HC_N61G	2,2	0,5	1,4	0,3
HC_D62V	31,9	5,6	95,0	20,4
HC_D62N	52,3	9,5	146,4	28,9
HC_H107M	8,1	1,6	5,6	1,7
LC_F31I	9,1	2,1	23,6	4,3
LC_F31M	1,7	0,4	1,3	0,4
LC_N35V LC_G56D	1,9	0,4	8,2	1,7
LC_N35L LC_G56A	3,1	0,7	6,9	1,6
LC_D33F LC_Y54F	4,3	0,9	7,9	1,9
HC_S30R HC_S57K	1,6	0,3	6,6	1,1
HC_N61G HC_D62V	8,0	1,1	31,1	9,1
HC_H107M LC_F31I	3,7	0,7	9,2	2,7
HC_G109A LC_D33R	3,8	0,6	8,0	1,3
HC_N61T LC_G167C	2,8	0,4	6,4	1,6
HC_K58M HC_D62N	6,6	1,2	15,2	4,5

En la Tabla 4 se facilitan algunos ejemplos de combinaciones de sustituciones aminoacídicas combinadas dentro de los anticuerpos de TFPI 4B7. Aunque en la Tabla 4 no se proporcionan todas las combinaciones, se contempla que el anticuerpo anti-TFPI puede comprender cualquier combinación de modificaciones proporcionadas. El nivel de expresión de las variantes se analizó por cuádruple en un ELISA de cuantificación. Si no se indica lo contrario, las variantes se normalizaron con respecto al respectivo

nivel de expresión y se analizó el rendimiento por cuádruple en el ELISA competitivo en TFPI murino y humano, seguido del cálculo de las proporciones entre el variante y la referencia (HC_D62R). En los casos en los que se usó una referencia diferente y las variantes se analizaron sin normalización previa, los valore se marcaron con un “*”. Para estas variantes, el valor indicado en la tabla se calculó multiplicando las proporciones variante/referencia alternativa con la referencia alternativa/HC_D62R. Los errores se calcularon mediante propagación de error desde las desviaciones estándar. no: no se detectó unión en las condiciones de ensayo usadas.

Tabla 4. Ejemplo de múltiples sustituciones de aminoácidos en 4B7.

HC_4B7										LC_4B7																		hTFPI		mTFPI	
Q1	N32	S37	G44	I53	K55	D62	H103	H107	Y112	M4	V30	F31	S32	D33	N35	T36	Y37	N39	L42	K44	Q50	L51	K55	G56	A60	D97	S98	variante/HC_D62R	error	variante/HC_D62R	error
	D					R			D				R		I													26,1	2,2	30,1	4,3
	D					R		M	D			I	R		I											T		18,2	3,6	8,7	1,4
	D					R			D					R	I													22,9	2,5	19,5	3,2
	D					S		M	D				R	R	T													19,6	1,9	20,3	3,2
	D					R	D					I		R														13,6	1,4	14,6	2,4
						R		M	D					F	I													20,0	3,4	36,6	9,8
	D					R			D					F	I											T		25,5	1,7	15,9	2,6
	D					R			D			I		F	I											T		23,3	3,1	11,9	2,2
						R		M	D			M		F														24,2	1,8	31,3	5,0
						R		M	D			I		R	I													22,0	2,2	35,4	5,0
	D					R	D	M	D				R		T													14,0	1,7	18,4	2,7
	D					Q			D			M	R	F	I													20,8	1,6	15,8	2,1
	D					R			D				R	F	I													29,7	2,2	42,0	5,9
	D					R		M	D				R	F	T													29,2	1,9	44,1	7,2
	D					Q		M	D					R	T													23,7	1,4	18,8	3,2
	D					Q		M	D				R		T													25,0	2,0	27,1	5,0

[illegible]

D						R		M	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
---	--	--	--	--	--	---	--	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Ejemplo 4. Purificación de anticuerpos

Las células se recolectan mediante centrifugación a 9.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se almacenan a -20 °C. El sobrenadante se intercambió con tampón con el tampón A (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300mM, imidazol 10 mM, pH 8,0), se concentró y purificó usando un procedimiento de purificación de dos etapas. Brevemente, 100 ml del sobrenadante concentrado se cargaron en de una columna de superflojo de Ni-NTA de 5 ml (Qiagen, 1018142), se lavaron primero con 5x volúmenes de la columna de tampón A seguido de 5x volúmenes de la columna de tampón B al 4,3 % (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM a pH 8,0) y se eluyeron con 7 volúmenes de tampón B. Las fracciones se combinan y dializan en PBS. En una segunda etapa de purificación, los anticuerpos purificados con Ni-NTA se incubaron con una matriz de afinidad específica de cadena ligera, es decir selección con captura de lambda o kappa (BAC 0849.010 y BAC 0833.10, respectivamente) para 2A8 and 4B7, respectivamente. Tras incubar a 4 °C durante la noche, la matriz se cargó en una columna, se lavó con 5 volúmenes de PBS, 5 volúmenes de arginina 500 mM NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 100 mM a pH 6,0 y, de nuevo, 5 volúmenes de PBS. Los anticuerpos se eluyeron con 6 volúmenes de glicina 100 mM a pH 3,0. seguido de 3 volúmenes de glicina 100 mM a pH 2,9 en 1/10 de un volumen total de HEPES 1M a pH 7,5 para neutralizar los eluidos. Por último, los eluatos se dializaron en PBS durante la noche a 4 ° C. Los anticuerpos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE y espectrometría

64
70

de masas.

Ejemplo 5. Medida de la afinidad de la unión del anticuerpo al TFPI usando resonancia de plasmón superficial (Biacore)

El TFPI humano o de ratón se inmovilizó sobre la superficie para analizar. Se usaron chips de CM5 y el kit de acoplamiento de amina (GE HealthCare) para la inmovilización del ligando de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de TFPI inmovilizado fue de aproximadamente 70 RU para adaptarse a la masa de anticuerpo que podía generar una $R_{\text{máx}}$ de 100 RU. Los anticuerpos anti-TFPI parentales y madurados con afinidad estaban en la fase móvil. La determinación de la afinidad se realizó con al menos cinco concentraciones diferentes (0,1, 0,4, 1,6, 6,4 y 25 nM) de los anticuerpos purificados.

Analizando las variantes de anticuerpo que contienen mutaciones sencillas en las regiones CDR, los inventores identificaron muchos clones que tenían una señal más alta en el ensayo de unión ELISA. Los clones seleccionados se purificaron y se analizó su afinidad por el TFPI humano o de ratón usando Biacore. Como se muestra en la Tabla 5 y la Tabla 6, estos clones tienen una afinidad por el TFPI mayor que los anticuerpos parentales 2A8 o 4B7. Aunque algunos de los mutantes de 2^a8 tienen una tasa de asociación (k_a) más lenta que el anticuerpo parental 2^a8, todos estos mutantes tienen una tasa de disociación (k_d) más lenta que 2A8. En general, estas mutaciones sencillas aumentan la afinidad de 2A8 en el intervalo de 1,47 veces

31

a 7,22 veces en el TFPI humano y de 1,71 veces a 7,20 veces en el TFPI de ratón. Cuando los autores analizaron las variantes de 4B7, la mutación D62R en el dominio CDR2 de la cadena pesada aumentó significativamente la señal. Este clon se escogió para la medición de la afinidad. Como se muestra en la Tabla 5 y la Tabla 6, esta mutación sencilla aumenta la afinidad de 4B7 por el RFPI humano de 11,1 nM a 58,2 pM, una mejora de 191 veces. La lenta tasa de disociación (kd) de 4B7HcD62R contribuye principalmente a la mejora de su afinidad, de $8,40 \times 10^{-3}$ /s de 4B7 a $1,65 \times 10^{-4}$ de 4B7HcD62R, una mejora de aproximadamente 50 veces. De un modo similar, esta mutación aumenta la afinidad de 4B7 por el TFPI de ratón de 58,6 nM a 427 pM a 427 pM, una mejora de 137 veces.

Tabla 5. Afinidad de determinadas variantes de 2A8 o 4B7 (mutación sencilla) del TFPI humano

Muestra	Clon	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Mejora
2A8-1	HC_G33P	2,71E+06	2,24E-03	8,27E-10	2,70
2A8-2	HC_S31P	2,91E+06	3,33E-03	1,15E-09	1,95
2A8-3	HC_S31V	3,84E+06	1,43E-03	3,73E-10	6,00
2A8-4	HC_S35D	4,01E+06	3,80E-03	9,50E-10	2,35
2A8-6	HC_I51E	1,29E+06	1,62E-03	1,26E-09	1,78
2A8-7	HC_S54F	2,81E+06	2,04E-03	7,27E-10	3,08
2A8-8	HC_S55R	4,30E+06	3,94E-03	9,17E-10	2,44
2A8-9	HC_K99L	2,60E+06	8,03E-04	3,09E-10	7,22
2A8-10	HC_K99V	2,55E+06	2,54E-03	9,95E-10	2,25

71
72

2A8-11	LC_A32N	2,70E+06	4,10E-03	1,52E-09	1,47
2A8-12	HC_I51D	3,61E+06	4,95E-03	1,37E-09	1,63
2A8-13	LC_N51V	4,26E+06	2,20E-03	5,18E-10	4,32
2A8-14	LC_Y48F	2,64E+06	3,00E-03	1,14E-09	1,97
2A8-15	LC_D91K	4,33E+06	2,09E-03	4,82E-10	4,64
2A8-16	LC_D91L	4,41E+06	4,40E-03	9,99E-10	2,24
2A8-17	LC_D91W	3,86E+06	4,32E-03	1,12E-09	2,00
2A8-20	2A8wt	3,13E+06	7,00E-03	2,24E-09	1,00
4B7HcD62R	HC_D62R	2,83E+06	1,65E-04	5,82E-11	190,83
4B7	4B7wt	7,56E+05	8,40E-03	1,11E-08	1,00

Tabla 6. Afinidad de determinadas variantes de 2A8 o 4B7 (mutación sencilla) del TFPI de ratón

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

72
73

Después, se investigó la afinidad de unión de mutaciones múltiples en 2A8 y 4B7. Como se muestra en la Tabla (7a) y la Tabla 8(a), los mutantes de 2A8 que contienen mutaciones múltiples en los dominios de CDR tienen una afinidad mayor que 2A8 con mutación sencilla en la unión del TFPI humano y del TFPI de ratón. Por ejemplo, 2A8-200 tiene una afinidad 53,7 veces mayor que 2A8 en la unión del TFPI humano y una afinidad 55,4 veces mayor en la unión del TFPI de ratón. Como se muestra en la Tabla 7(b) y la Tabla 8(b), los mutantes de 4B7 que contienen mutaciones múltiples en los dominios de CDR tienen una afinidad mayor que 4B7 con mutación sencilla en la unión del TFPI humano y del TFPI de ratón. Las variantes de las secuencias 2A8 y 4B7 parentales proporcionadas en las Tablas 7 y 8 también se han proporcionado en el listado de secuencias. Las SEQ ID N°: 5-11 corresponden a las variantes de la cadena pesada de 2A8 enumeradas en las Tablas 7 y 8. Las SEC ID N° 12-18 corresponden a las variantes de la cadena ligera de 2A8. Las SEQ ID N°: 19-26 corresponden a las variantes de la cadena pesada de 4B7 enumeradas en las Tablas 7 y 8. Las SEC ID N° 27-34 corresponden a las variantes de la cadena ligera de 4B7.

Tabla 7(a). Afinidad de determinadas variantes de 2A8 (mutaciones múltiples)
del TFPI humano

Muestras	2A8 HC								2A8 LC																ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD mejora	
	Q1	R30	S31	S35	I51	S55	S56	K99	D1	I2	A13	S21	R28	N29	Y48	N51	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	V96					
2A8-127				D				L								F	V	D							W	1,68E+06	1,41E-04	8,41E-11	22
2A8-143				D		R		L								F	V				L				W	2,88E+06	1,05E-04	3,64E-11	50,9
2A8-200				D		R		L								F	V				W					2,87E+06	9,88E-05	3,44E-11	53,7
2A8-216			V		D	R		V								F					L				W	3,29E+06	1,54E-04	4,67E-11	39,6
2A8-227				D				L								F					L				W	3,28E+06	1,23E-04	3,75E-11	49,4
2A8-g200	E	S		D		R	G	L	S	Y	S	T	P	K	F	V		M	A	W	S	S	T			6,17E+05	3,61E-05	5,84E-11	31,7
2A8-g216			V		D	R		V	S	Y	S	T	P	K	F	S		M		L	S		T	W	1,45E+06	5,29E-05	3,65E-11	50,7	
2A8 wt																										2,05E+06	3,80E-03	1,85E-09	1

Tabla 7(b). Afinidad de determinadas variantes de 4B7 (mutaciones múltiples)
del TFPI humano

Muestras	4B7 HC						4B7 LC					ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD mejora
	Q1	N32	G44	K55	D62	Y112	F31	S32	D33	N35	D67				
B18.5		D			Q	D	I		F	I		1,23E+06	3,18E-05	2,60E-11	428,2
B2.0		D			R	D		R	F	I	T	7,48E+06	3,81E-05	5,10E-12	2177,8
B27.1		D			R	D				T	T	2,78E+06	3,53E-05	1,27E-11	874,9
B32.5					R	D			F	I		2,15E+06	3,19E-05	1,48E-11	748,7
B41.2		D			R	D		R	F	I		3,48E+06	2,47E-05	7,16E-12	1552,7
B9.7		D			R	D		R		I		2,97E+06	2,61E-05	8,78E-12	1268,2
gB9.7	E	D	S	Y	R	D		R		I		8,38E+05	8,55E-06	1,02E-11	1091,5
gB9.7-IgG		D	S	Y	R	D		R		I		2,03E+06	1,56E-05	7,65E-12	1450,9
4B7												7,56E+05	8,40E-03	1,11E-08	1

Tabla 8(a). Afinidad de determinadas variantes de 2A8 (mutaciones múltiples) del TFPI de ratón

Muestra	2A8 HC																2A8 LC																ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	KD Mejora
	Q1	R30	S31	S35	I51	S55	S56	K99	D1	I2	A13	S21	R28	N29	Y48	N51	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	V96												
2A8-127				D				L								F	V	D							W	8,24E+05	1,47E-03	1,78E-10	18,5							
2A8-143				D		R		L								F	V				L				W	1,40E+06	1,25E-03	6,78E-11	48,5							
2A8-200				D		R		L								F	V				W					1,04E+06	6,19E-04	5,94E-11	55,4							
2A8-216			V		D	R		V								F					L				W	4,19E+06	2,16E-04	5,15E-11	63,9							
2A8-227				D				L								F					L				W	6,91E+06	1,06E-03	1,53E-10	21,4							
2A8-g200	E	S		D		R	G	L	S	Y	S	T	P	K	F	V		M	A	W	S	S	T			1,15E+06	1,39E-04	1,21E-10	27,3							
2A8-g216			V		D	R		V	S	Y	S	T	P	K	F	S		M		L	S		T	W		9,84E+05	7,78E-05	7,91E-11	41,6							
2A8 wt																										9,40E+05	3,10E-03	3,29E-09	1							

Tabla 8(b). Afinidad de determinadas variantes de 4B7 (mutaciones múltiples) del TFPI de ratón

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

#5
76

Ejemplo 6. Los anticuerpos de afinidad mejorada mostraron más potencia en el restablecimiento de la actividad del FXa

Para determinar si los anticuerpos anti-TFPI de afinidad mejorada también mejoraban su potencia en el restablecimiento de la actividad del FXa bloqueando el efecto inhibitor de la proteína TFPI, los autores realizaron un ensayo de restablecimiento de FXa. En este ensayo, una cantidad variada indicada de los anticuerpos individuales con afinidad mejorada (30 μ l) se incubó con la cantidad fija de TFPI recombinante humano, de ratón o de rata (20 μ l, 6,6 nM) en una mezcla de reacción total de 50 μ l durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 50 μ l de FXa (3,39 nM) a la mezcla de reacción y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después, a la mezcla de reacción se añadieron 20 μ l del sustrato de FXa Spectrozyme. Tras una incubación de 12 minutos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 405 nm usando un lector de placas (Molecular Device). Para cada experimento se obtuvo una curva lineal estándar de la misma cantidad de FXa (3,39 nM) inhibida por cantidades conocidas del TFPI. La actividad del FXa restablecida al 100 % se definió como la actividad del FXa sin añadir cualquier cantidad de TFPI y la actividad del 0 % se definió como la actividad del FXa en presencia de la proteína TFPI (6,6 nM). La concentración inhibidora semimáxima (CI50) se calculó de este modo para cada anticuerpo anti-TFPI individual, algunos de los cuales se proporcionan en la Tabla 9. La concentración eficaz semimáxima (CE50) también se calculó para determinadas variantes de 2A8 de segunda

70
77

ronda y se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 9. CI50 y mejora de la potencia para determinados anticuerpos anti-TFPI con sustituciones de un solo aminoácido usando el ensayo de restablecimiento de FXa en comparación con sus anticuerpos parentales, 2A8 y 4B7, respectivamente.

Muestra	Clon	CI50	
		(µg/ml),	Mejora
2A8-2	HC_S31P	0,33	1,7
2A8-3	HC_S31V	0,201	3,5
2A8-4	HC_S35D	0,55	1,1
2A8-6	HC_I51E	0,76	0,9
2A8-7	HC_S54F	0,35	2,0
2A8-9	HC_K99L	0,181	3,9
2A8-10	HC_K99V	0,39	1,6
2A8-14	LC_Y48F	0,34	1,9
2A8-15	LC_D91K	0,34	1,9
2A8-16	LC_D91L	0,37	1,7
2A8-17	LC_D91W	0,23	3,0
2A8-20	2A8wt	0,70	1,0
4B7HcD62R	HC_D62R	0,058	25
4B7	4B7wt	1,46	1,0

Tabla 10. CE50 y mejora para los anticuerpos anti-TFPI seleccionados que tienen múltiples sustituciones de aminoácidos en comparación con el 2A8 parental.

Muestras	2A8 HC						2A8 LC				CE50	
	S31	S35	I51	S55	K99	Y48	N51	G56	D91	V96	(nM)	Mejora
2A8-127		D			L	F	V	D		W	0,44	18,2
2A8-143		D		R	L	F	V		L	W	0,50	15,8
2A8-200		D		R	L	F	V		W		0,81	9,7
2A8-216	V		D	R	V	F			L	W	1,08	7,3
2A8-9					L						1,00	7,9
2A8 wt											7,91	1,00

Ejemplo 7. Los anticuerpos de afinidad mejorada mostraron más potencia en el acortamiento del tiempo de coagulación en un ensayo dPT

Para confirmar si estos anticuerpos de afinidad mejorada también mejoraban la potencia en el acortamiento del tiempo de coagulación se lleva a cabo un dPT determinando el efecto de determinados anticuerpos de afinidad mejorada sobre el tiempo de coagulación usando plasma humano con hemofilia A. El ensayo dPT se realiza esencialmente como se describe en Welsch y col. (Thrombosis Res., 1991, 64(2): 213-222). Brevemente, el plasma humano de hemofilia A (George King Biomedical) se prepara mezclando plasma con 0,1 volúmenes de tampón control (como control negativo) o los anticuerpos anti-TFPI indicados. Tras incubar durante 30 minutos a 25°C, cada una de las

78
79

muestras de plasma (100 μ l) preparadas se combinaron con 100 μ l de simplastina (Biomerieux) adecuadamente diluida (dilución 1:500) como fuente de tromboplastina y 100 μ l de cloruro cálcico 25 mM. El tiempo de coagulación se determina usando un vibrómetro STA4 (Stago) justo después de añadir cloruro cálcico.

Ejemplo 8. Los anticuerpos de afinidad mejorada mostraron más potencia en el acortamiento del tiempo de coagulación usando sangre de hemofilia A humana inducida con anticuerpos anti-Factor VIII

Para confirmar si los anticuerpos de afinidad mejorada mostraban más potencia en el acortamiento del tiempo de coagulación, los autores usaron un sistema ROTEM para analizar el efecto de estos anticuerpos sobre el tiempo de coagulación en sangre de heofilia A inducida con anticuerpos neutralizantes contra FVIII humano, que simula la sangre de pacientes de hemofilia A con inhibidores. El sistema ROTEM (Pentapharm GmbH) incluye un instrumento de cuatro canales, un ordenador, patrones de plasma, activadores y tazas y pinzas desechables. Los parámetros trombolastográficos de los sistemas hemostásicos ROTEM incluyen: Tiempo de coagulación (CT), que refleja el tiempo de reacción (tiempo requerido para obtener una amplitud de 2 mm tras el inicio de la recolección de datos) para el inicio de la coagulación sanguínea; tiempo de formación de coágulos (CFT) y el ángulo alfa para reflejar la propagación de la coagulación, y la amplitud máxima y los módulos elásticos máximos para reflejar la firmeza del coágulo. En un ensayo ROTEM, se usaron

79
80

300 μ l de sangre entera citrada recién extraída, en la que la actividad del FVIII se había neutralizado mediante la adición de anticuerpos policlonales contra el FVIII, para analizar el efecto de los anticuerpos anti-TFPI de afinidad mejorada en comparación con los anticuerpos anti-TFPI parentales. Todos los constituyentes se reconstituyeron y se mezclaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con recolección de datos durante el periodo de tiempo requerido para cada sistema. En pocas palabras, las muestras se mezclaron retirando/dispensando 300 μ l de sangre o plasma con una pipeta automática en tazas ROTEM con adición de 20 μ l de CaCl_2 (200 mmol), seguido por mezclado inmediato de la mezcla e inicio de la recolección de datos. Los datos se recogieron durante 2 horas usando un sistema ROTEM (versión del software 2,986) controlado por ordenador.

Un resultado ejemplo del ensayo ROTEM en la detección del efecto de los anticuerpos anti-TFPI de afinidad mejorada en el acortamiento del tiempo de coagulación sanguínea se muestra en las Figuras 2 y 3. La Figura 2 muestra el efecto de determinados anticuerpos anti-TFPI de afinidad madurada de primera ronda sobre el tiempo de coagulación de la sangre de hemofilia inducida por anticuerpos humanos. Los anticuerpos de afinidad muy mejorada. 2A8-9 y 2A8-17, muestran mucha más potencia en el acortamiento del tiempo de coagulación en sangre humana de hemofilia A inducida por anticuerpos, mientras que 2A8-10, cuya afinidad de unión al TFPI no había mejorado, presentaron una potencia de coagulación similar, en comparación con el

anticuerpo 2A8 parental.

Ejemplo 9. Los anticuerpos de afinidad mejorada muestran mejor tasa de supervivencia en un modelo de transección en la vena de la cola de ratones con hemofilia A

Para determinar si los anticuerpos de afinidad mejorada son más potentes en un efecto protector sobre ratones con hemorragia se usó un modelo de transección en la vena de la cola de ratones con hemofilia A. A través de la vena de la cola se administró a los ratones varias cantidades indicadas del anticuerpo anti-TFPI parental 2A8 o las varias cantidades indicadas de A200 24 horas antes de la lesión. A las 24 horas de la dosis se transeccionó la vena izquierda de la cola a 2,7 mm de la punta (en diámetro). La supervivencia se observó en las 24 horas posteriores a la transección. Se demostró que la tasa de supervivencia era dependiente de la dosis cuando se administraba con el FVIII recombinante (10 UI/kg a 30 UI/kg).

La Figura 4 muestra que un anticuerpo A200 seleccionado con afinidad mejorada prolongaba significativamente la supervivencia de los ratones con hemofilia A de un modo dependiente de la dosis en comparación con la IgG1 control de ratón (CTX IgG1) y mostraba una tasa de supervivencia mayor que el anticuerpo 2A8 parental a cada una de las dosis equivalentes.

Ejemplo 10. Los anticuerpos de afinidad mejorada mostraron mayor tiempo de coagulación usando plasma humano con hemofilia C (deficiente en FXI)

Además, se utilizó un ensayo ROTEM para analizar el efecto de los anticuerpos sobre el tiempo de coagulación en plasma humano deficiente en Factor XI (deficiente FXI), que simula los pacientes de hemofilia C. El resultado de este ensayo ROTEM en la detección del efecto de los anticuerpos anti-TFPI de afinidad mejorada en el acortamiento del tiempo de coagulación en plasma se muestra en la Figuras 5. La Figura 5 muestra que una variante de, 2 a 8, 2A8-200, potenciaba la coagulación en plasma humano de hemofilia A de un modo dependiente de la dosis y sus efectos son comparables con los del FVIII recombinante.

Aunque la presente invención se ha descrito con respecto a las formas de realización y ejemplos específicos, debe entenderse que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones y los equivalentes pueden sustituirse sin desviarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. La memoria y los ejemplos deben considerarse de naturaleza ilustrativa en vez de restrictivos. Además, todos los artículos, libros, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano IgG aislado que se une específicamente al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende:

(a) una cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 que comprende:

- una región CDR1 con una secuencia de aminoácidos DSVSSNSAAWS (residuos 27 a 37), que comprende la sustitución N32D relativa a la SEQ ID N° 3;

- una región CDR2 con una secuencia de aminoácidos ILYKRSKWYNDYAVSVKS (residuos 52 a 70), que comprende la sustitución D62R relativas a la SEQ ID N° 3;

- una región CDR3 con una secuencia de aminoácidos WHSDKHWGFDY (residuos 102 a 112), que comprende la sustitución Y112D relativa a la SEQ ID N° 3; y

(b) una cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 que comprende:

- una región CDR1 con una secuencia de aminoácidos RSSQSLVFSDGNTYLN (residuos 24 a 39); que comprende las sustituciones S32R y N35I relativas a la SEQ ID N° 4;

- una región CDR2 con una secuencia de aminoácidos KGSNRAS (residuos 55 a 61);

- una región CDR3 con una secuencia de aminoácidos QQYDSYPLT (residuos 94 a 102).

2. El anticuerpo monoclonal humano IgG aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 comprende la sustitución K55Y.

3. El anticuerpo monoclonal humano IgG aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 comprende la sustitución Q1E.

4. El anticuerpo monoclonal humano IgG aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 25, y la cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 33.

5. El anticuerpo monoclonal humano IgG aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 comprende las sustituciones N32D, G44S, K55Y, D62R, Y112D.

84
88

6. El anticuerpo monoclonal humano IgG aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 comprende las sustituciones Q1E, N32D, G44S, K55Y, D62R, Y112D.

7. El anticuerpo monoclonal humano IgG aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 26, y la cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 34.

8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

85
76

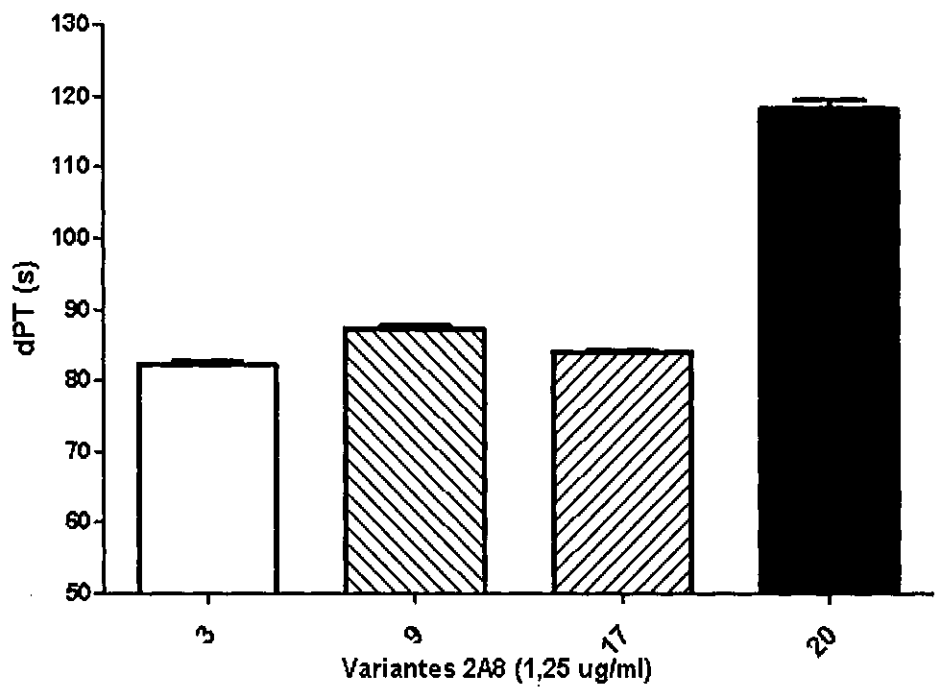
Resumen

Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados que se unen al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano. También se contemplan las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican anticuerpos monoclonales que se unen al TFPI. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti-TFPI y procedimientos de tratamiento de deficiencias o defectos en la coagulación mediante administración de los anticuerpos. También se proporcionan procedimientos para producir los anticuerpos.

86
87

01/05

Figura 1

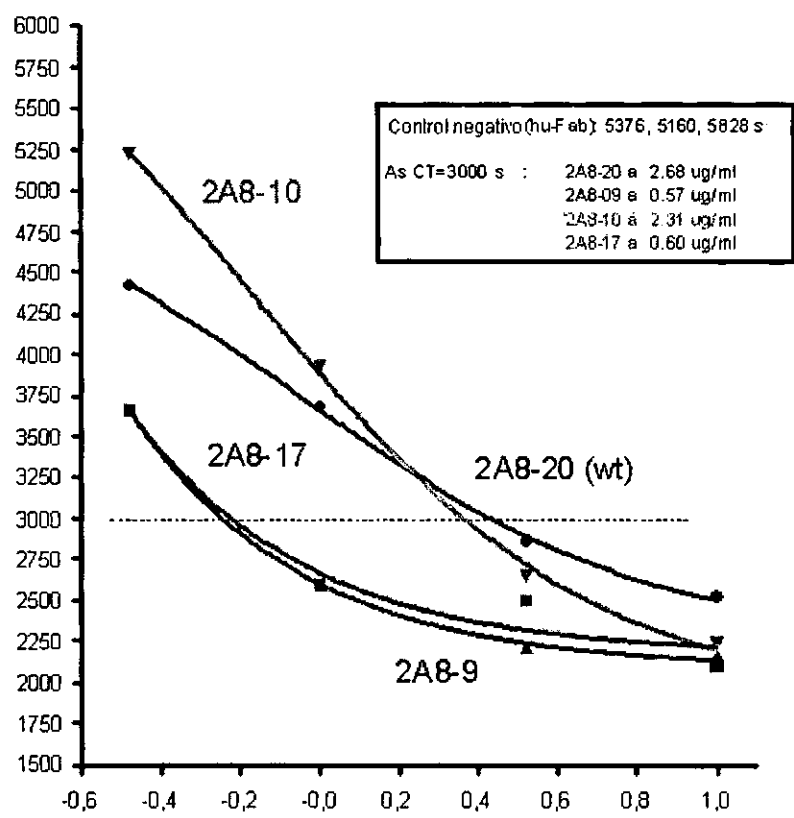


Número	Clon	Muestra
3	HC_S31V	2A8-3
9	HC_K99L	2A8-9
17	LC_D91W	2A8-17
20	Salvaje	2A8

87
88

02/05

Figura 2



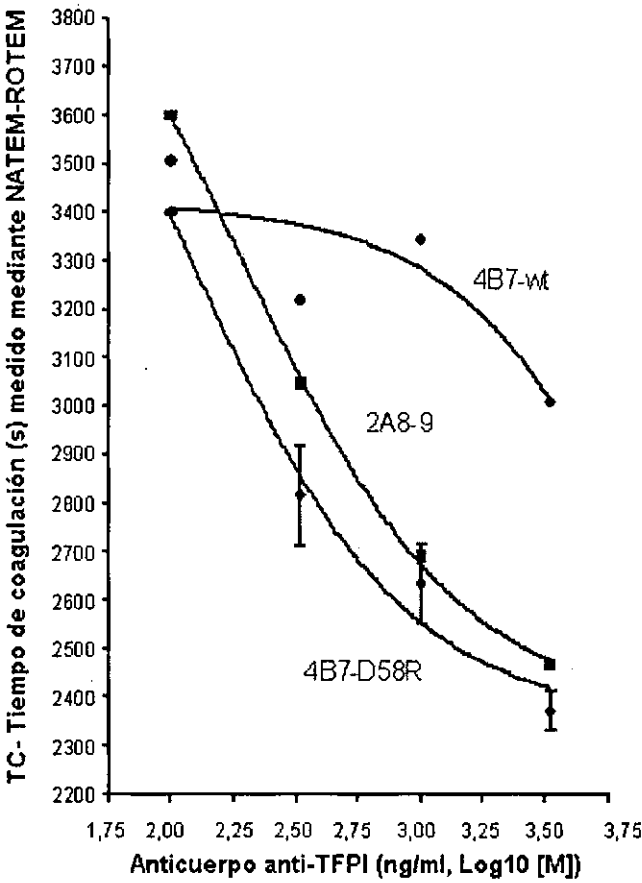
Número	Clon	Muestra
9	HC_K99L	2A8-9
10	HC_K99V	
17	LC_D91W	2A8-17
20	Tipo salvaje	2A8

88
89

03/05

Figura 3

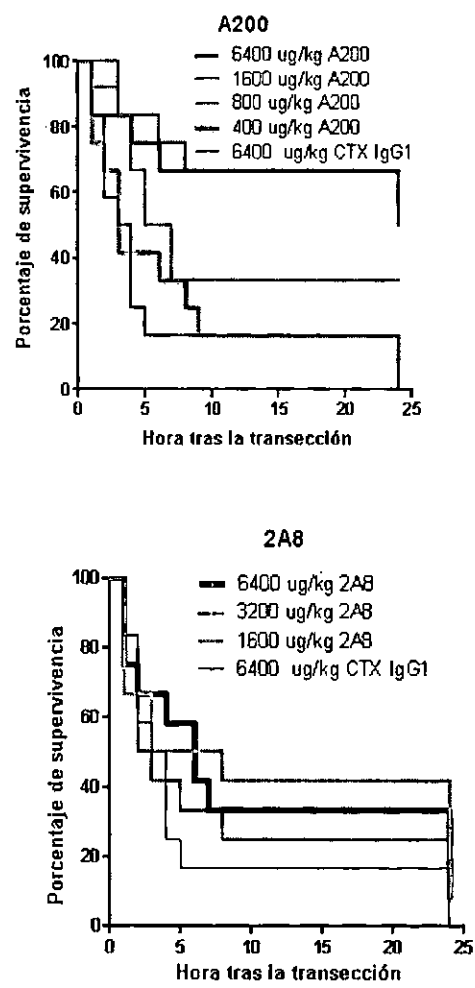
Actividad de coagulación del anticuerpo anti-TFPI en sangre entera de ratones con Hem-A
mezcla de sangre entera extraída de vena cava, D, Z.
NATEM-ROTEM, 8-18-09



Muestra	Clon
2A8-9	HC_K99L
4B7-D58R	HC_D62R
4B7	4B7 tipo salvaje

04/05

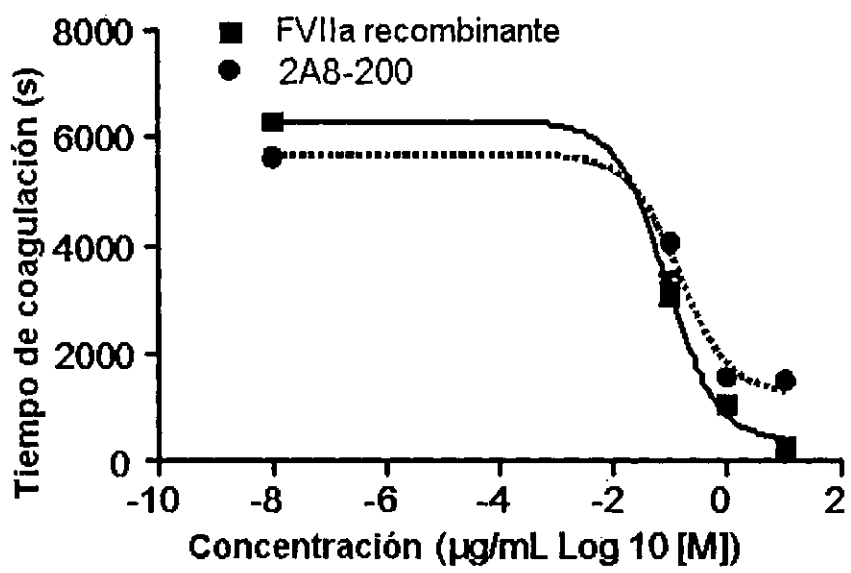
Figura 4



90
a1

05/05

Figura 5



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

92

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0030570

Bogotá D.C., Marzo 16 de 2015 - 12:27:12

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA

NI 800.020.909

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	1257	06/01/2015		185.000.00
RECIBO DE CA	999999999	1258	06/01/2015		185.000.00
RECIBO DE CA	999999999	14263	05/02/2015		109.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
			\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. Divisional Exp. 12149294

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-061429- -00000-0000

Fecha: 2015-03-17 15:45:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95-96

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-149294- -00012-0000

Fecha: 2015-03-17 15:45:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 95-96

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

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910185 Call Center: (571) 6513240

Marzo 16 de 2015 - 12:27:18

42
97

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION X PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: **DIVISION EXP. 12-149.294** (22) Fecha de solicitud: **31-08-2012**

(51) Clasificación Internacional:

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

(72) Inventor(es): **WANG, Zhuozhi; PAN, Junliang; GRUDZINSKA, Joanna; VOTSMEIER, Christian; TEBBE, Jan; BIRKENFELD, Joerg; WOBST, Nina; BRUECKNER, Simone; STEINIG, Susanne; SCHOLZ, Peter**

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

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) Pais
	61/309,290	01/03/2010	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: **01/10/2012**

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **01/03/2011**

No. de solicitud **PCT/US2011/026766**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **09/09/2011**

No. Publicación: **WO2011/109452 A1**

54) Título **ANTICUERPOS MONOCLONALES OPTIMIZADOS CONTRA EL INHIBIDOR DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)**

(57) Resumen: Un anticuerpo monoclonal humano IgG aislado que se une específicamente al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende:

(a) una cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 que comprende:

- una región CDR1 con una secuencia de aminoácidos DSVSSNSAAWS (residuos 27 a 37), que comprende la sustitución N32D relativa a la SEQ ID N° 3; y

CONTINUA

(b) una cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 que comprende:

- una región CDR1 con una secuencia de aminoácidos RSSQSLVFS DGNTYL N (residuos 24 a 39); que comprende las sustituciones S32R y N35I relativas a la SEQ ID N° 4;
- una región CDR2 con una secuencia de aminoácidos KGSNRAS (residuos 55 a 61);
- una región CDR3 con una secuencia de aminoácidos QQYDSYPLT (residuos 94 a 102).

93

(21) N° de solicitud: **DIVISION EXP. 12-149.294**

(22) Fecha de solicitud: **31-08-2012**

94

(51) Clasificación Internacional :

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

(72) Inventor(es): **WANG, Zhuozhi; PAN, Junliang; GRUDZINSKA, Joanna; VOTSMEIER, Christian; TEBBE, Jan; BIRKENFELD, Joerg; WOBST, Nina; BRUECKNER, Simone; STEINIG, Susanne; SCHOLZ, Peter**

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

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		61/309,290		01/03/2010		US

(85) Fecha inicio fase nacional: **01/10/2012**

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **01/03/2011**

No. de solicitud **PCT/US2011/026766**

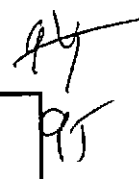
(87)

Publicación internacional

Fecha: **09/09/2011** (dd/mm/aa)

N° publicación: **WO2011/109452 A1**

(54) Título **ANTICUERPOS MONOCLONALES OPTIMIZADOS CONTRA EL INHIBIDOR DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)**



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: DIVISION EXP. 12-149.294 22) Fecha de solicitud: 31-08-2012		(51) Int Cl: (71) Solicitante(s) BAYER HEALTHCARE LLC	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/309,290 01/03/2010 US	(72) Inventor(es) WANG, Zhuozhi PAN, Junliang GRUDZINSKA, Joanna VOTSMEIER, Christian TEBBE, Jan BIRKENFELD, Joerg WOBST, Nina BRUECKNER, Simone STEINIG, Susanne SCHOLZ, Peter (74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS		
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 01/10/2012 Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 01/03/2011 No. de solicitud PCT/US2011/026766		(87) Publicación Internacional Fecha: 09/09/2011 Fecha (dd/mm/aa) N° publicación: WO2011/109452 A1	
(54) Titulo: ANTICUERPOS MONOCLONALES OPTIMIZADOS CONTRA EL INHIBIDOR DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR (TFPI)			

Resumen

Un anticuerpo monoclonal humano IgG aislado que se une específicamente al inhibidor de la vía del factor tisular humano, en el que el anticuerpo comprende:

- (a) una cadena pesada humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 que comprende:
- una región CDR1 con una secuencia de aminoácidos DSVSSNSAAWS (residuos 27 a 37), que comprende la sustitución N32D relativa a la SEQ ID N° 3;
 - una región CDR2 con una secuencia de aminoácidos ILYKRSKWYNDYAVSVKS (residuos 52 a 70), que comprende la sustitución D62R relativas a la SEQ ID N° 3;
 - una región CDR3 con una secuencia de aminoácidos WHSDKHWGFDY (residuos 102 a 112), que comprende la sustitución Y112D relativa a la SEQ ID N° 3; y
- (b) una cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 que comprende:
- una región CDR1 con una secuencia de aminoácidos RSSQSLVFSDGNTYLN (residuos 24 a 39); que comprende las sustituciones S32R y N35I relativas a la SEQ ID N° 4;
 - una región CDR2 con una secuencia de aminoácidos KGSNRAS (residuos 55 a 61);
 - una región CDR3 con una secuencia de aminoácidos QQYDSYPLT (residuos 94 a 102).



No. 15-061429-00000-0000

Fecha: 2015-03-17 15:45:27
 Tra. 11 PATENTEIYII
 Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Eve: 378 FASENACIONALI
 Folios: 95-96

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

ADM

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-149294-00012-0000

Fecha: 2015-03-17 15:45:27
 Tra. 11 PATENTEIYII
 Act. 851 DIVISIONAL

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Eve: 378 FASENACIONALI
 Folios: 95-96

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

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

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

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

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