República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0924058-6 B1

(22) Data do Depósito: 18/12/2009

(45) Data de Concessão: 17/08/2021

(54) Título: ANTICORPOS MONOCLONAIS, SEUS USOS, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/38; A61K 39/395; A61P 7/04.

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2008 EP 08172520.2.

(73) Titular(es): NOVO NORDISK A/S.

(72) Inventor(es): BERIT OLSEN KROGH; OLE HVILSTED OLSEN; JENS BREINHOLT; BRIAN LAURITZEN; BRIT BINOW SORENSEN; IDA HILDEN; JES THORN CLAUSEN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009067598 de 18/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/072691 de 01/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/06/2011

(57) Resumo: ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA INIBIDOR DA VIA DE FATOR TECIDUAL, SEUS USOS, CÉLULA EUCARIÓTICA, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A invenção refere-se a anticorpos que especificamente se ligam ao inibidor da via de fator tecidual (TFPI) e que reduzem o tempo de coagulação do sangue. Tais anticorpos têm utilidade no tratamento de indivíduos com uma coagulopatia./

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPOS MONOCLONAIS, SEUS USOS, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".**

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se relaciona a anticorpos que especificamente se ligam ao inibidor da via de fator tecidual (TFPI).

Antecedentes da Invenção

[0002] Em indivíduos com uma coagulopatia, tal como em seres humanos com hemofilia A e B, várias etapas da cascata de coagulação são não funcionais devido, por exemplo, à ausência ou à presença insuficiente de um fator de coagulação. Tal disfunção de uma parte da cascata de coagulação resulta em coagulação sanguínea insuficiente e potencialmente hemorragia com risco de morte, ou dano a órgãos internos, tais como articulações. Indivíduos, tais como seres humanos com hemofilia A e B podem receber terapia de substituição de fator de coagulação, tal como FVIIIa ou FIXa exógenos, respectivamente. Entretanto, tais pacientes estão em risco do desenvolvimento de "inibidores" (anticorpos) para tais fatores exógenos, tornando terapia outrora eficiente, ineficaz. Além disso, fatores de coagulação exógenos somente podem ser administrados intravenosamente, que é de considerável inconveniência e desconforto para os pacientes. Por exemplo, crianças e crianças pequenas precisam ter inseridos cirurgicamente cateteres intravenosos em uma veia do peito, para o acesso venoso ser garantido. Isto as deixa em grande risco de desenvolver infecções bacterianas. Indivíduos com uma coagulopatia somente podem receber terapia depois que o sangramento começou, em vez de profilaticamente, que muitas vezes infringe sua qualidade de vida geral.

[0003] Há dessa forma ainda muitas necessidades médicas não supridas na comunidade de hemofilia, em particular, e em indivíduos

com coagulopatias, em geral.

[0004] Quando uma parede vascular é prejudicada, o fator tecidual (TF) é exposto aos conteúdos do sangue circulante e TF forma um complexo com o Fator VII/Fator VII ativado (FVII/FVIIa) na superfície de células de que carregam TF. Isto leva à ativação do Fator X (FX) a FXa que em conjunto com FVa gera uma quantidade limitada de trombina (FIIa). Pequenas quantidades de trombina ativam plaquetas, que resulta na exposição superficial de fosfolipídeos que dão suporte à ligação do complexo tenase composto de FVIIIa/FIXa.

[0005] O complexo tenase produz grandes quantidades de FXa, que posteriormente facilita um incremento de trombina. O incremento de trombina é necessário para a formação de uma estrutura de fibrina mecanicamente forte e estabilização do tampão hemostático. FVIII ou FIX falham ou estão presentes em níveis baixos em pacientes com hemofilia, e devido à falta de atividade da tenase, a capacidade de gerar FXa é baixa e insuficiente para suportar a fase de propagação da coagulação. Ao contrário, a fase de iniciação mediada por TF não é dependente da formação do complexo tenase. Entretanto, a via TF, um pouco após uma geração de FXa inicial, será bloqueada por inibidores plasmáticos.

[0006] O inibidor da via de fator tecidual (TFPI) regula para baixo a coagulação contínua pela neutralização da atividade catalítica de FXa e inibição do complexo TF-FVIIa na presença de FXa. TFPI inibe o complexo TF/FVIIa/FXa na superfície celular ou inibe FXa liberado seguido pela inibição FVIIa/TF.

Sumário da Invenção

[0007] Os Inventores identificaram anticorpos monoclonais que especificamente se ligam ao inibidor da via de fator tecidual ("TFPI", às vezes referido como "TFPI1") e por meio disso modulam sua atividade. A presente invenção se relaciona a estes anticorpos e a outros

anticorpos relacionados que são derivados destes anticorpos ou têm propriedades de ligação similares a estes anticorpos.

[0008] Consequentemente, a presente invenção se relaciona a anticorpos que especificamente se ligam ao inibidor da via de fator tecidual (TFPI) e que reduzem o tempo de coagulação em, por exemplo, (a) plasma e/ou sangue total humano (b) deficientes em FVIII humano.

[0009] Um anticorpo compreende a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 4 e a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 8. Outro anticorpo compreende a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 18.

[00010] A invenção também fornece polinucleotídeos que codificam um anticorpo da invenção, tal como polinucleotídeos que codificam uma cadeia leve de anticorpo e/ou uma cadeia pesada de anticorpo da invenção.

[00011] A invenção também fornece composições farmacêuticas que compreendem um anticorpo ou polinucleotídeo da invenção e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[00012] Os anticorpos, polinucleotídeos e composições da invenção também são fornecidos para (a) uso no tratamento ou prevenção de uma coagulopatia (desordem de sangramento) ou (b) estimulação da coagulação sanguínea. Isto é, a invenção fornece um método de (a) tratamento ou prevenção de uma coagulopatia (desordem de sangramento) ou (b) estimulação da coagulação sanguínea, o método compreendendo administração a um paciente que o requer de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo, polinucleotídeo ou composição da invenção.

[00013] Além disso, a invenção fornece regimes de dosagem do dito anticorpo monoclonal da invenção.

Breve Descrição das Figuras

[00014] A Figura 1 mostra as sequências de domínios VH (A) e VL (B) anti-TFPI4F36A1B2 do camundongo (neste pedido também referido como MuTFPI4F36 ou 4F36), alinhado com as sequências da linhagem germinativa humana e a versão de CDR inicial enxertada de TFPI4F36 humanizado. A numeração do esquema Kabat é indicada acima das sequências.

[00015] A Figura 2 mostra sequências nucleotídicas e sequências polipeptídicas traduzidas de sequências VH e VL do anticorpo murino TFPI4F36A1B2 (MuTFPI4F36).

[00016] A Figura 3 mostra as sequências de aminoácidos das cadeias leves (A) e pesadas (B) dos fragmentos Fab do anticorpo murino 4F36, MuTFPI4F36. Numeração acima das sequências é mostrada de acordo com Kabat. As posições correspondentes a alças de CDR são destacadas no texto sublinhado em negrito na numeração de Kabat. Os resíduos de aminoácidos que constituem o parátopo são destacados no texto sublinhado em negrito. O parátopo é determinado a partir da estrutura de raio x do complexo entre o Fab MuTFPI4F36 e o domínio K2 de TFPI e é definido como resíduos no Fab tendo um átomo pesado dentro de uma distância de menos de 4 Å de um átomo pesado em K2.

[00017] A Figura 4 mostra a sequência de TFPI (sequência de peptídeo sinal omitida). Os domínios Kunitz são mostrados em negrito: domínio Kunitz 1 de TFPI = aminoácidos 26 a 76; domínio Kunitz 2 de TFPI = aminoácidos 97 a 147; domínio Kunitz 3 de TFPI = aminoácidos 188 a 238. A parte C-terminal de TFPI é mostrada em itálico nos aminoácidos 240 a 276.

[00018] A Figura 5 mostra a aceitabilidade relativa de resíduos em TFPI. Os resíduos que têm uma aceitabilidade maior que 40% são aminoácidos 94 a 95, 98, 100 a 110, 118 a 121, 123 a 124, 131, 134,

138 a 142 e 144 a 145.

[00019] A Figura 6 mostra uma análise SEC de HPLC de um complexo entre o domínio Kunitz 2 de TFPI (K2) e o fragmento Fab MuTFPI4F36 (Fab). Os cromatogramas de SEC-HPLC detectaram em UV 280 nm de K2 livre (linha sólida, tr 13,1 min, pico mostrado em 13,134), Fab livre (linha quebrada, tr 11,7 min, pico mostrado em 11,676) e complexo (linha pontilhada, tr 11,5 min, pico mostrado em 11,496). A amostra do complexo continha K2 em excesso de ~20%.

[00020] A Figura 7 mostra a estrutura total do complexo Fab MuTFPI4F36:K2. As cadeias leves são mostradas em cinza pálido e cadeias pesadas são mostrados em cinza escuro. As alças de CDR assim definidas de acordo com o esquema Kabat são marcadas como L1 a L3 e H1 a H3.

[00021] A Figura 8 mostra a estrutura do domínio K2 de TFPI quando em um complexo com Fab MuTFPI4F36 (molécula de Fab não mostrada). Os N e C-terminais e os elementos estruturais secundários são marcados.

[00022] A Figura 9 mostra uma superposição de esqueleto de estruturas de K2. Diferenças de demonstrações na estrutura entre a solução K2, K2 está no complexo com Fab MuTFPI4F36 e K2 no complexo com a tripsina porcina.

[00023] A Figura 10 mostra ao MuTFPI4F36 o epitopo de ligação em K2. (A) Ilustração representativa do domínio K2 de TFPI com cadeias laterais de resíduos incluídos no epitopo de ligação representado por bolas e paus. **(B**) é como A, mas com a superfície adicionada. **(C**) epitopo de ligação mapeado na sequência primária. As letras capitais em negrito, em itálico e sublinhadas corresponde a resíduos nos contatos de criação de epitopo de ligação de K2 com a cadeia pesada de Fab MuTFPI4F36 somente (posições 10, 11, 13, 28, 31, 33 e 35), cadeia leve somente (posições 21, 23 e 50), e tanto com

cadeia pesada como com leve (17, 19, 34 e 36), respectivamente. Os elementos estruturais secundários (h = hélice, s = folha) são indicados (hélices nas posições 5 a 8 e 50 a 56 e folhas nas posições 20 a 26 e 31 a 37). Os resíduos destacados em cinza (posições 1 a 2 e 59 a 66) estão presentes na proteína expressa, mas não são observados na estrutura cristalina devido aos N e C-terminais que são flexíveis.

[00024] A Figura 11 mostra uma comparação dos traços de esqueleto de complexos K2:Fab MuTFPI4F36 e Fab K2:HzTFPI4F36, demonstrando os modos de ligação idênticos dos fragmentos MuTFPI4F36 murinos e Fab HzTFPI4F36 humanizados. O K2:Fab MuTFPI4F36 é mostrado em cinza e K2:Fab HzTFPI4F36 em preto. As estruturas são superposicionadas para otimizar a combinação entre a região variável dos fragmentos Fab.

[00025] A Figura 12 mostra o efeito de anticorpos monoclonais anti-TFPI (mAbs) na ativação induzida por TF/FVIIa de FX na superfície de HUVECs estimuladas com TNF α/IL1 β. A ativação de FX foi medida na presença de mAB 0 a 20 nM (mAbTFPI 2021 ou mAb 2974), FVIIa 50 pM (NovoSeven ®) e FX 50 nM no tampão com HEPES 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3,5 mM, CaCl2 5 mM, BSA 1 mg/mL pH 7,4 (0,1%) que foi recoberto uma monocamada de HUVECs. A atividade FXa gerada foi determinada em um ensaio amidolítico com S-2765 medido pelo aumento na absorvância em 405 nM.

[00026] A Figura 13 mostra o efeito de mAbs anti-TFPI na inibição de TFPI da ativação induzida por TF/FVIIa de FX na superfície do células 231 MDA-Mb. A ativação de FX foi medida na presença de mAb 0 a 20 nM (Hz mAbTFPI 2021 ou mAb 2974), fl-TFPI 2,5 nM, FVIIa 100 pM e FX 50 nM no tampão com HEPES 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3,5 mM, 5 mM CaCl, BSA 1 mg/mL pH 7,4 (0,1%) que foi recoberto com uma monocamada de células 231MDA-Mb. A atividade de FXa gerada foi determinada em um ensaio amidolítico com S-2765

medido pelo aumento na absorvância em 405 nM.

[00027] A Figura 14 mostra o efeito de substituições únicas por aminoácido alanina de resíduos escolhidos dentro do domínio Kunitz 2 de TFPI na ligação até mAbTFPI 2021 ("mAb4F36") e mAb2974 (n=2). Os resíduos selecionados são parte do epitopo de ligação a mABTFPI 2021. A numeração de resíduos de aminoácidos é como indicada na Fig. 10C.

[00028] A Figura 15 mostra o tempo de sangramento da cutícula e a perda sanguínea medida em coelhos hemofílicos transientes após tratamento com IgG controle (Hemofilia) ou com anticorpo anti-TFPI murino, TFPI-4F36A1B2 ("4F36", MuTFPI4F36).

[00029] A Figura 16 mostra o tempo de sangramento da cutícula (observação única; média ± SEM) e a perda sanguínea (média+SEM) em um tratamento "sob demanda" de coelhos com hemofilia induzida pelo anticorpo, tratados com HzTFPI4F36 ("anti-TFPI", mAbTFPI 2021) (2 mg/kg) ou NovoSeven (9mg/kg) 5 minutos após indução da hemorragia. A hemorragia foi observada por 1 hora (3600 segundos).

[00030] A Figura 17 mostra o tempo de sangramento da cutícula (observação única; média ± SEM) e perda sanguínea (média+SEM) em coelhos com hemofilia induzida pelo anticorpo, quando pré-tratados com HzTFPI4F36 ("anti-TFPI", mAbTFPI 2021) (doses: 0,5, 1, 2 mg/kg) ou um anticorpo isotípico controle 35 minutos antes da indução da hemorragia. A hemorragia foi observada por 1 hora (3600 segundos).

[00031] A Figura 18 mostra o número de plaquetas medido em animais individuais, após estimulação com anticorpo anti-FVIII, administração de um anti-TFPI-anticorpo ("ab anti-TFPI", MuTFPI4F36) e então sangrados. Isto foi realizado em um modelo de hemofilia de controle e na presença do anticorpo anti-TFPI murino 4F36 (MuTFPI4F36) como descrito neste pedido.

[00032] A Figura 19 mostra a concentração plasmática de HzTFPI4F36 livre (mAbTFPI 2021) em coelhos dosados com HzTFPI4F36 de 20 mg/kg em 0 horas. Experimentos de hemorragia de cutícula foram realizados em 96 horas (4 dias), 168 horas (7 dias) e 240 horas (10 dias). As linhas pontilhadas indicam ‘a concentração eficaz' da faixa de HzTFPI4F36 como encontrado no estudo dose-resposta (ver Fig. 17).

[00033] A Figura 20: painel esquerdo: HzTFPI4F36 plasmático (mAbTFPI 2021) (eixo esquerdo: ○) e tempo de sangramento de cutícula (média+SEM; ■). Painel direito: HzTFPI4F36 plasmático (mAbTFPI 2021) (eixo esquerdo: ○) e perda sanguínea (média+SEM; ■) em coelhos com hemofilia induzida pelo anticorpo, quando pré-tratados com HzTFPI4F36 20 mg/kg (n=8) ou anticorpo isotípico controle (n=12) em 4, 7 ou 10 dias antes da indução da hemorragia. A hemorragia foi observada por 1 hora (3600 segundos).

[00034] A Figura 21 mostra os níveis de concentração plasmática após administração IV e SC de HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) a macacos. Nos três gráficos inferiores, dois macacos foram administrados com três doses de HzTFPI4F36 com intervalo de duas semanas. Em três doses esquerdas mais baixas de 2, 20 e 80 mg/kg foram administrados, no meio mais baixo três doses de 20, 80 e 160 mg/kg foram administradas; em três doses certas mais baixas de 80, 160 e 200 mg/kg foram dosados. No superior esquerdo uma dose única de 20 mg/kg foi administrada a três macacos; no direito superior como dose única IV foram administrados a três macacos. Nos gráficos, os pontos representam a observação individual ao passo que a linha representa o modelo próprio.

[00035] A Figura 22 mostra uma simulação de HzTFPI4F36 de 1 mg/kg (mAbTFPI 2021) sc administrada diariamente. A linha horizontal sólida representa níveis de concentração plasmáticos simulados e a

linha horizontal pontilhada, a concentração eficaz superior como deduzido dos dados de efeito.

[00036] A Figura 23 mostra uma simulação de HzTFPI4F36 de 15 mg/kg (mAbTFPI 2021), administrado intravenosamente a cada terceira semana. A linha horizontal sólida representa níveis de concentração plasmáticos simulados e a linha horizontal pontilhada a concentração eficaz superior como deduzido dos dados de efeito.

[00037] A Figura 24 mostra uma simulação de HzTFPI4F36 de 20 mg/kg (mAbTFPI 2021), administrado intravenosamente a cada segunda semana. A linha sólida horizontal representa níveis de concentração plasmáticos simulados e a linha pontilhada horizontal a saturação alvo esperada como deduzido do estudo de efeito.

Breve Descrição da Listagem de Sequência

[00038] A SEQ ID NO: 1 fornece a sequência de aminoácidos de TFPI humano (sequência de peptídeo sinal omitida).

[00039] A SEQ ID NO: 2 fornece a sequência de aminoácidos de um construto usado para determinar o epitopo de ligação de um anticorpo. O construto compreende aminoácidos 91 a 150 de TFPI humano e uma marcação de His6 C-terminal.

[00040] As SEQ ID NOs: 3, 5 e 4 fornecem o polinucleotídeo (sentido e antissentido) e sequências polipeptídicas do domínio variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal MuTFPI4F36 (TFPI-4F36A1B2). A SEQ ID NO: 6 fornece a sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo monoclonal MuTFPI4F36 (TFPI-4F36A1B2). As sequências de peptídeo sinal são omitidas.

[00041] As SEQ ID NOs: 7, 9 e 8 fornecem sequências polinucleotídicas (sentido e antissentido) e polipeptídicas do domínio variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal MuTFPI4F36 (TFPI-4F36A1B2). SEQ ID NO: 10 fornece a sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo monoclonal MuTFPI4F36

(TFPI-4F36A1B2). As sequências de peptídeo sinal são omitidas.

[00042] A SEQ ID NO: 11 fornece a sequência de um iniciador de sentido reverso usado para a amplificação de domínio variável da cadeia pesada e SEQ ID NO: 12 fornece a sequência de um iniciador de sentido reverso usado para a amplificação da cadeia leve.

[00043] As SEQ ID NOs: 13 a 15 fornecem sequências polinucleotídicas sentido, polinucleotídicas antissentido e polipeptídicas, respectivamente, para o domínio variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021). As sequências de peptídeo sinal são omitidas.

[00044] As SEQ ID NOs: 16 a 18 fornecem sequências polinucleotídicas sentido, polinucleotídicas antissentido e polipeptídicas, respectivamente, para o domínio variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021).

[00045] As SEQ ID NOs: 19 a 21 fornecem sequências polinucleotídicas sentido, polinucleotídicas antissentido e polipeptídicas, respectivamente, para a cadeia leve (LC) do anticorpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021).

[00046] As SEQ ID NOs: 22 a 24 fornecem sequências polinucleotídicas sentido, polinucleotídicas antissentido e polipeptídicas, respectivamente, para a cadeia pesada (HC) do anticorpo monoclonal humanizado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021). As sequências de peptídeo sinal são omitidas.

[00047] As SEQ ID NOs: 25 a 26 fornecem as sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos, respectivamente, para o domínio variável da cadeia leve do HzTFPI4F36 enxertado por CDR. As sequências de peptídeo sinal são omitidas.

[00048] As SEQ ID NOs: 27 a 28 fornecem sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos, respectivamente, do domínio variável da

cadeia pesada do HzTFPI4F36 enxertado por CDR. As sequências de peptídeo sinal são omitidas.

[00049] A SEQ ID NO: 29 fornece a sequência de aminoácidos da cadeia leve do HzTFPI4F36 enxertado por CDR (cadeia capa humana). A sequência de peptídeo sinal é omitida.

[00050] A SEQ ID NO: 30 fornece a sequência de aminoácidos da cadeia pesada do HzTFPI4F36 enxertado por CDR, que é uma IgG4 humana (S241P). A sequência de peptídeo sinal é omitida.

[00051] A SEQ ID NO: 31 fornece a sequência de linhagem germinativa, VKII_A18/JK4, usada para a humanização da cadeia leve de MuTFPI4F36. A sequência de peptídeo sinal é omitida.

[00052] A SEQ ID NO: 32 fornece a sequência de linhagem germinativa, VH3_21/JH6, usada para a humanização da cadeia pesada de MuTFPI4F36. A sequência de peptídeo sinal é omitida.

[00053] A SEQ ID NO: 33 fornece a sequência de aminoácidos da cadeia pesada MuTFPI4F36A1B2 Fab. O peptídeo sinal é omitido.

[00054] SEQ ID NO: 34 fornece a sequência de aminoácidos da cadeia pesada HzTFPI4F36 Fab. O peptídeo sinal é omitido.

Descrição Detalhada da Invenção

[00055] A presente invenção se relaciona a anticorpos que se ligam a TFPI. Os anticorpos preferencialmente especificamente se ligam a TFPI, isto é, ligam-se a TFPI, mas não se ligam, ou se ligam com uma afinidade inferior, a outras moléculas. Em particular, a invenção se relaciona a anticorpos que se ligam a TFPI e que modulam sua atividade. Os anticorpos da invenção podem possuir dessa forma a capacidade de encurtar o tempo de coagulação. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ter a capacidade de encurtar o tempo de coagulação no plasma deficiente de FVIII humano ou reduzir o tempo para coagular como medido em uma análise do sangue total humano por tromboelastografia (TEG). A invenção também se relaciona a usos

de tais anticorpos, tais como usos terapêuticos e farmacêuticos.

[00056] O termo TFPI como usado neste pedido engloba qualquer forma que ocorre naturalmente de TFPI que pode ser derivado de qualquer organismo adequado. Por exemplo, TFPI para uso como descrito neste pedido pode ser um TFPI mamífero, tal como TFPI humano, de camundongo, rato, primata, bovino, ovino ou porcino. Preferencialmente, o TFPI é TFPI humano. O TFPI pode ser uma forma madura de TFPI, tal como uma proteína de TFPI que sofreu processamento pós-tradução dentro de uma célula adequada. Uma proteína TFPI madura, por exemplo, pode ser glicosilada. O TFPI pode ser uma proteína de TFPI completa. O termo TFPI também engloba variantes, isoformas e outros homólogos de tais moléculas de TFPI. As moléculas de TFPI variantes serão geralmente caracterizadas tendo o mesmo tipo de atividade de TFPI que ocorre naturalmente, tal como a capacidade de neutralizar a atividade catalítica de FXa, ou capacidade de inibir um complexo de TF-FVIIa/FXa.

[00057] Um anticorpo da invenção terá a capacidade de se ligar a TFPI. Preferencialmente, um anticorpo da invenção ligará especificamente a TFPI. Isto é, um anticorpo da invenção se ligará preferencialmente a TFPI com maior afinidade de ligação do que aquele no qual se liga a outra molécula. Um anticorpo da invenção pode ter a capacidade de se ligar ou especificamente se ligar a uma molécula de TFPI como descrito neste pedido, tais como qualquer molécula alvo como descrito neste pedido.

[00058] O termo "afinidade de ligação" é neste pedido usado como uma medida da força de uma interação não covalente entre duas moléculas, por exemplo, e anticorpo ou fragmento do mesmo, e um antígeno. O termo "afinidade de ligação" é usado para descrever interações monovalentes (atividade intrínseca).

[00059] A afinidade de ligação entre duas moléculas, por exemplo,

um anticorpo ou fragmento do mesmo, e um antígeno, por uma interação monovalente pode ser quantificada pela determinação da constante de dissociação (K_D). Por sua vez, K_D pode ser determinado pela medida da cinética de formação de complexo e dissociação, por exemplo, pelo método SPR (Biacore). As constantes de taxa correspondente à associação e a dissociação de um complexo monovalente são referidas como constante de taxa de associação k_a (ou k_{on}) e constante de taxa de dissociação k_d. (ou k_{off}), respectivamente. K_D está relacionado a k_a e k_d pela equação $K_D = k_d / k_a$.

[00060] Após a definição acima mencionada, as afinidades de ligação associadas a interações moleculares diferentes, por exemplo, a comparação da afinidade de ligação de anticorpos diferentes de um dado antígeno, podem ser comparadas pela comparação dos valores de KD dos complexos anticorpo/antígeno individuais.

[00061] Similarmente, a especificidade de uma interação pode ser avaliada por determinação e comparação do valor de KD da interação de interesse, por exemplo, uma interação específica entre um anticorpo e um antígeno, com o valor de KD de uma interação de não interesse.

[00062] Tipicamente, o KD do anticorpo com respeito ao objetivo será de 2 vezes, preferencialmente de 5 vezes, mais preferencialmente de 10 vezes menos do que KD com respeito ao outro, molécula não alvo, tal como material não relacionado ou material acompanhante no ambiente. Mais preferencialmente, o KD será de 50 vezes menos, tal como de 100 vezes menos, ou de 200 vezes menos; mesmo mais preferencialmente de 500 vezes menos, tal como de 1.000 vezes menos, ou de 10.000 vezes menos.

[00063] O valor desta constante de dissociação pode ser determinado diretamente por métodos bem conhecidos, e pode ser

computado até para misturas complexas por métodos, tais como aqueles, por exemplo, apresentados em Caceci et al. (Byte 9:340-362, 1984). Por exemplo, KD pode ser estabelecido usando um ensaio de ligação de filtro de nitrocelulose de filtro duplo, tal como aquele revelado por Wong & Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432, 1993). Outros ensaios de padrão para avaliar a capacidade de ligação de ligantes, tais como anticorpos em direção a alvos são conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ELISAs, Western blots, RIAs e análise por citometria de fluxo. A cinética de ligação e a afinidade de ligação do anticorpo também podem ser avaliadas por ensaios padrão conhecidos na técnica, tais como Ressonância de plásmons de superfície (SPR), por exemplo, usando um sistema Biacore™.

[00064] Um ensaio de ligação competitivo pode ser conduzido no qual a ligação do anticorpo ao alvo é comparada com a ligação do alvo a outro ligante daquele alvo, tal como outro anticorpo. A concentração na qual a inibição de 50% ocorre é conhecida como Ki. Sob condições ideais, Ki é equivalente a KD. O valor de Ki nunca será menor que KD, portanto a medida de Ki pode ser convenientemente substituída para fornecer um limite superior de KD.

[00065] Um anticorpo da invenção pode ter um KD de seu alvo de 1 x 10-7M ou menos, 1 x 10-8M ou menos, ou 1 x 10-9M ou menos, ou 1 x 10-10M ou menos, 1 x 10-11M ou menos ou 1 x 10-12M ou menos.

[00066] Um anticorpo que especificamente se liga a seu objetivo pode ligar-se a seu objetivo com uma alta afinidade, isto é, exibindo um KD baixo como discutido acima, e pode ligar-se a outro, moléculas não alvo com uma afinidade mais baixa. Por exemplo, o anticorpo pode ligar-se para não visar moléculas com um KD de 1 x 10-6M ou mais, mais preferencialmente 1 x 10-5 M ou mais, mais preferencialmente 1 x 10^{-4} M ou mais, mais preferencialmente 1 x 10^{-3}

M ou mais, ainda mais preferencialmente 1 x 10^{-2} M ou mais. Um anticorpo da invenção é preferencialmente capaz da ligação ao seu alvo com uma afinidade que é pelo menos de duas vezes, de 10 vezes, de 50 vezes, de 100 vezes, de 200 vezes, de 500 vezes, de 1.000 vezes ou de 10.000 vezes ou maior que sua afinidade para ligar-se a outra molécula não alvo.

[00067] A molécula alvo pode ser qualquer molécula de TFPI como descrita neste pedido, tal como uma molécula de TFPI que ocorre naturalmente, uma molécula de TFPI totalmente madura ou uma molécula de TFPI inteira. As moléculas de TFPI preferenciais são totalmente maduras, de ocorrência natural, moléculas de TFPI mamíferas completas. Por exemplo, a molécula de TFPI pode consistir de, ou pode compreender, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou um fragmento ou outra variante da mesma como descrito neste pedido.

[00068] A molécula alvo pode ser uma variante de uma molécula de TFPI, tal como um fragmento de uma molécula de TFPI. Por exemplo, a molécula alvo pode ser um fragmento ou outra variante de TFPI que mantém um epitopo adequado da ligação de anticorpo. Por exemplo, a molécula alvo pode ser um fragmento ou outra variante de TFPI que conserva um epitopo como descrito neste pedido. A molécula alvo pode compreender tal epitopo.

[00069] Em uma modalidade, a molécula alvo é uma molécula de TFPI completa. A molécula de TFPI completa pode compreender um primeiro, segundo e terceiro domínio Kunitz como descrito neste pedido. A molécula de TFPI completa pode compreender um primeiro, segundo e terceiro domínio Kunitz como descrito neste pedido e também uma região carbóxi terminal como descrito neste pedido. A molécula de TFPI completa pode ser uma molécula de TFPI que ocorre naturalmente, tal como um polipeptídeo de TFPI completo como

expresso de um gene de TFPI, ou como secretado por células de expressão de TFPI. A molécula de TFPI completa pode ser uma molécula de TFPI que ocorre naturalmente como encontrado circulante na forma livre no plasma ou ligada a células, tais como células endoteliais. A molécula de TFPI completa não é uma molécula de TFPI truncada, tal como uma molécula de TFPI truncada que ocorre naturalmente como descrito neste pedido.

[00070] Em uma modalidade, a molécula alvo é uma molécula de TFPI truncada. Por exemplo, a molécula de TFPI truncada pode compreender um truncamento de carbóxi terminal. Por exemplo, diversas formas truncadas ocorrem naturalmente de TFPI são conhecidas. Estas podem compreender um truncamento de parte ou toda a parte de carbóxi terminal de TFPI. Podem compreender ainda o truncamento de parte ou todos de um ou mais dos domínios Kunitz. Por exemplo, uma forma truncada de TFPI pode compreender a deleção da parte do carbóxi terminal e parte, ou todos, do terceiro domínio Kunitz.

[00071] Por exemplo, uma forma truncada que ocorre naturalmente de TFPI compreende somente aminoácidos 1 a 161 da molécula de TFPI completa (referida neste pedido como TFPI (1 a 161)). TFPI (1 a 161) é uma forma ativa de TFPI que reduziu a atividade comparada com a molécula completa. TFPI (1 a 161) diferencia-se na estrutura do TFPI completo e anticorpos gerados contra TFPI (1 a 161) como uma molécula alvo, por isso, pode diferenciar-se de anticorpos gerados contra TFPI completo.

[00072] Uma forma truncada de TFPI pode ser uma molécula alvo apropriada onde é desejado para visar anticorpos contra a região do comprimento completo TFPI que está presente em TFPI (1 a 161). Entretanto, TFPI truncado é preferencialmente usado como uma molécula alvo quando os anticorpos são desejados para ser dirigidos

contra formas truncadas específicas de TFPI, tais como TFPI truncado que ocorre naturalmente.

[00073] Em uma modalidade, a molécula alvo é uma forma de TFPI que ocorre naturalmente. Isto pode ser usado em uma forma na qual é presente *in vivo*. Por exemplo, a molécula alvo pode ser um TFPI completo que ocorre naturalmente como discutido acima. A molécula alvo pode ser um TFPI truncado que ocorre naturalmente como discutido acima. A molécula alvo pode ser TFPI em uma forma na qual está presente no plasma *in vivo*. A molécula alvo pode ser TFPI que está ligado à lipoproteína do mesmo modo que está presente no plasma *in vivo*. A molécula alvo pode ser TFPI que está ligado a células do mesmo modo que ocorre *in vivo*, tal como TFPI que está ligado a células endoteliais. Um anticorpo da invenção pode ligar a qualquer um ou mais destas formas que ocorrem naturalmente de TFPI. O anticorpo da invenção pode ser capaz de ligar a todas destas formas que ocorrem naturalmente de TFPI, ou pode ser capaz de discriminar entre estas formas diferentes, ligando-se a alguns, mas não a outros.

[00074] Em uma modalidade, a molécula alvo é, ou compreende, o segundo domínio Kunitz de TFPI. Tal molécula alvo pode compreender aminoácidos 97 a 147 da SEQ ID NO: 1 ou aminoácidos 91 a 150 da SEQ ID NO: 1 ou uma região equivalente ao domínio Kunitz 2 de outro polipeptídeo de TFPI. Tal molécula alvo pode compreender SEQ ID NO: 2 ou aminoácidos 3 a 58 ou 10 a 50 da SEQ ID NO: 2. A molécula alvo pode ser, ou pode compreender, um fragmento do segundo domínio Kunitz de TFPI. Por exemplo, a molécula alvo pode compreender cinco ou mais, oito ou mais, dez ou mais, doze ou mais ou quinze ou mais aminoácidos do segundo domínio Kunitz.

[00075] A molécula alvo pode compreender cinco ou mais, oito ou mais, dez ou mais, doze ou mais ou quinze ou mais resíduos de

superfície acessíveis de TFPI ou de uma região particular de TFPI, tais como um domínio Kunitz particular ou a parte C terminal de TFPI. Um resíduo acessível superficial é um resíduo que tem aceitabilidade relativa de mais de 40%. Por exemplo, para o domínio Kunitz 2 de TFPI (SEQ ID NO: 1), os seguintes aminoácidos têm uma aceitabilidade relativa maior que 40%: 94 a 95, 98, 100 a 110, 118 a 121, 123 a 124, 131, 134, 138 a 142 e 144 a 145 (ver Figura 5). A molécula alvo pode compreender cinco ou mais, oito ou mais, dez ou mais, doze ou mais ou quinze ou mais destes resíduos, tais como um fragmento de TFPI que inclui cinco ou mais, oito ou mais, dez ou mais, doze ou mais ou quinze ou mais destes resíduos.

[00076] A molécula alvo pode compreender um epitopo conhecido de TFPI.

[00077] O termo "epitopo", como usado neste pedido, é definido no contexto de uma interação molecular entre um "antígeno polipeptídeo de ligação" (Ab) e seu "antígeno" correspondente (Ag). Como usado neste pedido, o termo Ab compreende um anticorpo ou um fragmento do mesmo, que especificamente se liga a Ag correspondente. Exemplos de fragmentos de ligação a antígeno incluem Fab, Fab', F (ab) 2, F(ab')2, F(ab)S, Fv (tipicamente domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo), a cadeia única Fv (scFv; ver por exemplo, Bird et al., Science 1988; 242:42S-426; e Huston et al. PNAS 1988; 85:5879-5883), fragmentos dsFv, Fd (tipicamente domínio VH e CHI), e dAb (tipicamente um domínio VH); domínios VH, VL, VhH, e V-NAR; moléculas monovalentes que compreendem uma cadeia VH única e uma VL única; minicorpos, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, e corpos capa (ver, por exemplo, Ill et al. Protein Eng 1997; 10:949-57); IgG de camelo; IgNAR; bem como uma ou mais CDRs isoladas ou um parátopo funcional, onde as CDRs isoladas ou os resíduos de ligação a antígeno ou polipeptídeos podem estar associados ou ligados em

conjunto para formar um fragmento de anticorpo funcional. Vários tipos de fragmentos de anticorpos foram descritos ou revistos em, por exemplo, Holliger and Hudson, Nat Biotechnol 2005; 2S:1126-1136; WO2005040219, e Pedidos de Patentes Americanas publicados 20050238646 e 20020161201.

[00078] Os fragmentos de anticorpos podem ser obtidos usando técnicas de engenharia recombinante ou proteicas convencionais, e os fragmentos podem ser rastreados para a ligação a antígeno ou outra função da mesma maneira que podem ser anticorpos intactos.

[00079] O termo antígeno (Ag) se refere à entidade molecular usada para a imunização de um vertebrado imunocompetente para produzir o anticorpo (Ab) que reconhece Ag. Neste pedido, Ag é denominado mais amplamente e é geralmente destinado a incluir moléculas alvo que são especificamente reconhecidas por Ab, dessa forma incluindo fragmentos ou mimetiza da molécula usada no processo de imunização de levantar o Ab. Dessa forma, para Ab de ligação ao segundo domínio kunitz (K2) de TFPI, ambos isolaram K2, TFPI inteiro incluindo variantes truncadas e outras de TFPI referidas como Ag.

[00080] Geralmente, o termo "epitopo" se refere à área ou região em Ag à qual um Ab especificamente se liga, isto é, a área ou região em contato físico com o Ab. Um epitopo proteico pode compreender resíduos de aminoácidos no Ag que estão diretamente envolvidos na ligação a um Ab (também chamado de componente imunodominante do epitopo) e outros resíduos de aminoácidos, que não estão diretamente envolvidos na ligação, tal como os resíduos de aminoácidos de Ag que estão efetivamente bloqueados pelo Ab (em outras palavras, o resíduo de aminoácido está dentro da "superfície excluída do solvente" e/ou "característica" do Ab). O termo epitopo neste pedido inclui ambos os tipos de sítios de ligação em qualquer

região particular de K2 em TFPI que especificamente se liga a um anticorpo anti-TFPI, ou outro agente específico para K2 de acordo com a invenção, a menos que de outra maneira afirmado (por exemplo, em alguns contextos que a invenção se relaciona a anticorpos que se ligam diretamente a resíduos particulares de aminoácidos). K2 pode compreender diversos epitopos diferentes, que podem incluir, sem limitação, (1) determinantes antigênicos de peptídeo linear, (2) determinantes antigênicos conformacionais que consistem de um ou mais aminoácidos não contíguos localizados próximos entre si na conformação de K2 maduro; e (3) determinantes antigênicos pós-tradução que consistem, inteiro ou em parte, de estruturas moleculares covalentemente ligadas a K2, tais como grupos carboidrato.

[00081] O epitopo de um dado par anticorpo (Ab)/antígeno (Ag) pode ser definido e caracterizado em níveis diferentes de detalhes usando uma variedade de métodos de mapeamento de epitopo experimentais e computacionais. Os métodos experimentais incluem mutagênese, cristalografia de raio x, espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (NMR), Espectrometria de massa por troca de hidrogênio-deutério (HX-MS) e vários métodos de ligação por competição. Como cada método depende de um princípio único, a descrição de um epitopo é intimamente ligada ao método pelo qual foi determinado. Dessa forma, o epitopo de um dado par Ab/Ag será definido diferentemente dependendo do método de mapeamento de epitopo empregado.

[00082] Em seu nível mais detalhado, o epitopo de interação entre Ag e o Ab pode ser definido pelas coordenadas espaciais que definem os contatos atômicos presentes na interação Ag-Ab, bem como informação sobre suas contribuições relativas para a termodinâmica de ligação. Em um nível menos detalhado, o epitopo pode ser caracterizado pelas coordenadas espaciais que definem os contatos

atômicos entre Ag e Ab. Em um nível menos detalhado adicional, o epitopo pode ser caracterizado pelos resíduos de aminoácidos que compreende como definido por um critério específico, por exemplo, distância entre átomos no Ab e no Ag. Em um nível menos detalhado adicional, o epitopo pode ser caracterizado pela função, por exemplo, pela ligação de competição com outros Abs. O epitopo também pode ser definido mais genericamente como compreendendo resíduos de aminoácidos para os quais a substituição por outro aminoácido alterará as características da interação entre o Ab e Ag.

[00083] No contexto de uma estrutura cristalina derivada por raio x definida por coordenadas espaciais de um complexo entre um Ab, por exemplo, um fragmento Fab, e seu Ag, o termo epitopo é neste pedido, a menos que de outra maneira especificado ou contradito pelo contexto, especificamente definido como resíduos de K2 caracterizados tendo um átomo pesado (isto é, um átomo não hidrogênio) em uma distância de 4 Å de um átomo pesado no Ab.

[00084] De fato, as descrições e definições de epitopos, dependente do método de mapeamento de epitopo usado, são obtidas em níveis diferentes de detalhe, segue-se que a comparação de epitopos para Abs diferentes no mesmo Ag pode ser similarmente conduzida em níveis diferentes de detalhe.

[00085] Epitopos descritos no nível de aminoácido, por exemplo, determinados de uma estrutura de raio x, são ditos serem idênticos se contiverem o mesmo conjunto de resíduos de aminoácidos. Epitopos são ditos serem sobrepostos se pelo menos um aminoácido for compartilhado pelos epitopos. Epitopos são ditos separados (únicos) se nenhum resíduo de aminoácido for compartilhado pelos epitopos.

[00086] Epitopos caracterizados pela ligação de competição são ditos sobrepostos se a ligação de Ab correspondente for mutuamente exclusiva, isto é, a ligação de um Ab exclui a ligação simultânea de

outro Ab. Epitopos são ditos ser separados (únicos) se Ag for capaz de acomodar a ligação de ambos Abs correspondentes simultaneamente.

[00087] A definição do termo "parátopo" é derivada da definição "do epitopo" acima mencionada pela inversão da perspectiva. Dessa forma, o termo "parátopo" se refere à área ou região no Ab ao qual Ag especificamente se liga, isto é, ao qual faz contato físico com o Ag.

[00088] No contexto de uma estrutura cristalina derivada por raio x definida por coordenadas espaciais de um complexo entre um Ab, por exemplo, um fragmento Fab, e seu Ag, o termo parátopo é neste pedido, a menos que de outra maneira especificado ou contradito pelo contexto, especificamente definido como resíduos de Ag caracterizados tendo um átomo pesado (isto é, um átomo não hidrogênio) em uma distância de 4 Å de um átomo pesado em K2.

[00089] O epitopo e o parátopo de um dado par anticorpo (Ab) / antígeno (Ag) podem ser identificados por métodos regulares. Por exemplo, a posição geral de um epitopo pode ser determinada pela avaliação da capacidade de um anticorpo de ligação a fragmentos diferentes ou polipeptídeos de TFPI variantes. Os aminoácidos específicos dentro de TFPI que entram em contato com um anticorpo (epitopo) e os aminoácidos específicos em um anticorpo que entram em contato com TFPI (parátopo) também podem ser determinados usando métodos regulares, tais como aqueles descritos nos exemplos. Por exemplo, o anticorpo e a molécula alvo podem ser combinados e o complexo Ab/Ag pode ser cristalizado. A estrutura cristalina do complexo pode ser determinada e usada para identificar sítios específicos de interação entre o anticorpo e seu alvo.

[00090] Os presentes inventores realizaram tal análise de interação entre o anticorpo MuTFPI4F36 murino, bem como o anticorpo HzTFPI4F36 humanizado, descrito neste pedido, e o domínio Kunitz 2 (K2) de TFPI. Esta análise é descrita em mais detalhes nos exemplos.

[00091] O parátopo de um anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser definido como se segue: a cadeia leve do dito anticorpo compreende resíduos E31, S32, D33, Y37, A96, T97 e F99 da SEQ ID NO: 15 e a cadeia pesada do dito anticorpo compreende resíduos N31, S52, R53, S54, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 e D106 de SEQ ID NO 18.

[00092] A cadeia leve do anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender dessa forma resíduos de aminoácidos:

- E, na posição correspondente à posição 31,
- S, na posição correspondente à posição 32,
- D, na posição correspondente à posição 33,
- Y, na posição correspondente à posição 37,
- A, na posição correspondente à posição 96,
- T, na posição correspondente à posição 97 e
- F, na posição correspondente à posição 99

da SEQ ID NO: 15;

e a cadeia pesada do dito anticorpo pode compreender resíduos de aminoácidos:

- N, na posição correspondente à posição 31,
- R, na posição correspondente à posição 53,
- S, na posição correspondente à posição 54,
- Y, na posição correspondente à posição 57,
- Y, na posição correspondente à posição 59,
- F, na posição correspondente à posição 60,
- P, na posição correspondente à posição 61,
- D, na posição correspondente à posição 62,
- Q, na posição correspondente à posição 65,
- Y, na posição correspondente à posição 102,
- D, na posição correspondente à posição 103 e
- D, na posição correspondente à posição 106

da SEQ ID NO 18.

[00093] A cadeia pesada pode compreender ainda um S na posição correspondente à posição 52 da SEQ ID NO: 18.

[00094] A cadeia leve de um anticorpo de acordo com a presente invenção pode compreender ainda um H na posição correspondente à posição 98 da SEQ ID NO: 15 e a cadeia pesada podem compreender ainda um S, na posição correspondente à posição 56 da SEQ ID NO: 18.

[00095] Para MuTFPI4F36 (Exemplo 4) foi encontrado que o epitopo era composto de aminoácidos E100, E101, P103, R107, Y109, T111, Y113, Q118, Q121, E123, R124, F125, K126 e L140 da SEQ ID NO: 1, correspondentes a aminoácidos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2. Foi encontrado que o parátopo era composto de resíduos de aminoácidos da cadeia leve E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 e F99 da SEQ ID NO: 4 e os resíduos de aminoácidos da cadeia pesada N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 e D106 da SEQ ID NO 8.

[00096] Para HzTFPI4F36 (Exemplo 5) foi encontrado que o epitopo era composto de aminoácidos E100, E101, D102, P103, R107, Y109, T111, Y113, F114, N116, Q118, Q121, C122, E123, R124, F125, K126 e L140 da SEQ ID NO: 1, correspondentes a aminoácidos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2. Foi encontrado que o parátopo era composto de resíduos de aminoácidos da cadeia leve E31, S32, D33, Y37, A96, T97 e F99 da SEQ ID NO: 15 e os resíduos de aminoácidos da cadeia pesada N31, S52, R53, S54, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 e D106 de SEQ ID NO 18.

[00097] Um anticorpo de acordo com a presente invenção pode ligar-se ao mesmo epitopo ou ao domínio de TFPI como os anticorpos

da invenção que são especificamente revelados neste pedido. Por exemplo, outros anticorpos ainda não identificados da invenção podem ser identificados pela comparação de sua ligação a TFPI com aquele dos anticorpos monoclonais, MuTFPI4F36 e/ou HzTFPI4F36; ou pela comparação da função de anticorpos ainda não identificados com aquele de MuTFPI4F36 e/ou HzTFPI4F36. Análises e ensaios que podem ser usados com o objetivo de tal identificação incluem ensaios de neutralização de TFPI, tais como: o ensaio de inibição de FXa descrito no exemplo 6 e o ensaio de inibição FVIIa/TF/FXa descrito no exemplo 7; análises de interação de ligação, tais como a análise de ressonância de plásmons de superfície descrita no exemplo 8; ensaios celulares, tais como a neutralização de TFPI em células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs), descritos no exemplo 9, e a neutralização de inibição de TFPI de atividade TF/FVIIa sobre células 231 MDA-Mb de carcinoma de mama humano, descritas no exemplo 10.

[00098] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção pode ligar-se ao mesmo epitopo ou região que os anticorpos MuTFPI4F36 ou HzTFPI4F36 descritos neste pedido. A ligação de MuTFPI4F36 e HzTFPI4F36 a TFPI é descrita em mais detalhes neste pedido. Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo em TFPI que os anticorpos MuTFPI4F36 ou HzTFPI4F36. Isto pode inclui-lo estando em contato com os aminoácidos particulares de TFPI como descrito acima. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ligar-se a TFPI de tal modo que está em contato com aminoácidos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2. ou de tal modo que está no contato com os aminoácidos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2.

[00099] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um

epitopo compreendendo um ou mais resíduos selecionados a partir do grupo consistindo em E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, F35, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2.

[000100] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo E10 da SEQ ID NO: 2.

[000101] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo E11 da SEQ ID NO: 2).

[000102] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo D12 da SEQ ID NO: 2.

[000103] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo P13 da SEQ ID NO: 2.

[000104] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo R17 da SEQ ID NO: 2.

[000105] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo Y19 da SEQ ID NO: 2.

[000106] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo T21 da SEQ ID NO: 2.

[000107] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo Y23 da SEQ ID NO: 2.

[000108] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo F24 da SEQ ID NO: 2.

[000109] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo N26 da SEQ ID NO: 2.

[000110] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo Q28 da SEQ ID NO: 2.

[000111] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo Q31 da SEQ ID NO: 2.

[000112] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo C32 da SEQ ID NO: 2.

[000113] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um

epitopo compreendendo o resíduo E33 da SEQ ID NO: 2.

[000114] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo R34 da SEQ ID NO: 2.

[000115] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo F35 da SEQ ID NO: 2.

[000116] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo K36 da SEQ ID NO: 2.

[000117] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo o resíduo L50 da SEQ ID NO: 2.

[000118] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo os resíduos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2.

[000119] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação a um epitopo compreendendo os resíduos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2.

[000120] Um anticorpo da invenção pode ter a capacidade de competir com outro anticorpo da invenção para ligação a TFPI ou outro alvo apropriado como descrito neste pedido. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode competir cruzadamente com os anticorpos MuTFPI4F36 ou HzTFPI4F36 descritos neste pedido para ligação a TFPI, ou a um fragmento adequado ou variante de TFPI que está ligado aos anticorpos MuTFPI4F36 ou HzTFPI4F36. Tais anticorpos de competição cruzada podem ser identificados baseados na sua capacidade de competição cruzada com um anticorpo conhecido da invenção em ensaios de ligação padrão. Por exemplo, SPR, por exemplo, usando um sistema Biacore™, ensaios de ELISA ou citometria de fluxo podem ser usados para demonstrar competição cruzada. Tal competição cruzada pode sugerir que os dois anticorpos se liguem a epitopos idênticos, sobrepostos ou similares.

[000121] Dessa forma, o anticorpo da invenção pode ser capaz de ligação ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que qualquer um ou mais dos anticorpos monoclonais seguintes comercialmente disponíveis: mAb0281 (Ab systems) e/ou mAb4904 (American Diagnostica) e/ou mAb2974 (R&D systems) e/ou mAb29741 (R&D systems).

[000122] Um anticorpo da invenção, por isso, pode ser identificado por um método que compreende um ensaio de ligação que avalia se um anticorpo teste é capaz de competir com um anticorpo conhecido da invenção de um sítio de ligação na molécula alvo. Métodos para realização de ensaios de ligação competitivos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, podem envolver a ligação de um anticorpo conhecido da invenção para uma molécula alvo usando condições sob as quais o anticorpo pode ligar-se à molécula alvo. O complexo anticorpo/alvo então pode ser exposto a um anticorpo teste e a extensão até a qual o anticorpo teste é capaz de deslocar o anticorpo da invenção de complexos de anticorpo/alvo pode ser avaliado. Um método alternativo pode envolver contato de um anticorpo teste com uma molécula alvo sob condições que permitem o anticorpo ligar, em seguida adicionando um anticorpo da invenção que é capaz de ligação daquela molécula alvo e avaliação da extensão até a qual o anticorpo da invenção é capaz de deslocar o anticorpo teste de complexos de anticorpo/alvo.

[000123] A capacidade de um anticorpo teste de inibir a ligação de um anticorpo da invenção ao alvo demonstra que o composto teste pode competir com um anticorpo da invenção para ligação ao alvo e dessa forma que o anticorpo teste se liga ao mesmo epitopo ou região na proteína de TFPI como o anticorpo conhecido da invenção. Um anticorpo teste que é identificado como competindo com um anticorpo conhecido da invenção em tal método é também um anticorpo

potencial de acordo com a presente invenção. O fato que o anticorpo teste pode ligar TFPI na mesma região que um anticorpo conhecido da invenção e competir com o anticorpo conhecido da invenção sugere que o anticorpo teste possa atuar como um ligante no mesmo sítio de ligação que o anticorpo conhecido e que o anticorpo teste, por isso, pode mimetizar a ação do anticorpo conhecido. Isto pode ser confirmado pela avaliação da atividade de TFPI na presença do composto teste como descrito neste pedido.

[000124] O anticorpo conhecido da invenção pode ser um anticorpo como descrito neste pedido, tal como o anticorpo murino TFPI-4F36A1B2 (também referido como 4F36 e como MuTFPI4F36), ou qualquer variante ou fragmento do mesmo como descrito neste pedido que conserva a capacidade de ligação a TFPI, tais como anticorpos humanizados TFPI-4F36A1B2, um dos quais é neste pedido referido como HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021). Um anticorpo da invenção pode ligar-se ao mesmo epitopo que o anticorpo MuTFPI4F36 como descrito neste pedido ou qualquer variante ou fragmento do mesmo como descrito neste pedido que conserva a capacidade de ligar a TFPI, tal como HzTFPI4F36.

[000125] Um anticorpo da invenção pode ligar-se a um epitopo que é idêntico, sobrepõe-se, ou é similar ao epitopo MuTFPI4F36 que é ainda descrito nos exemplos. Um anticorpo da invenção pode ligar-se a um epitopo que é idêntico, sobrepõe-se ou é similar ao epitopo HzTFPI4F36 que é ainda descrito nos exemplos. Um anticorpo da invenção pode ligar-se, preferencialmente especificamente, um ou mais resíduos de aminoácidos que pertencem aos epitopos de MuTFPI4F36 e/ou HzTFPI4F36. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ligar-se a cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais ou dez ou mais dos resíduos de aminoácidos estabelecidos acima para ligação de MuTFPI4F36 ou HzTFPI4F36.

Por exemplo, quando contatado com um polipeptídeo da SEQ ID NO: 2, um anticorpo da invenção pode ligar-se ao polipeptídeo e entrar em contato com aminoácidos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, F35, K36 e L50, ou um subconjunto daqueles aminoácidos, tais como pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17 ou pelo menos 18 daqueles aminoácidos.

[000126] Ligação específica pode ser avaliada com referência à ligação do anticorpo a uma molécula que não é o alvo. Esta comparação pode ser feita pela comparação da capacidade de um anticorpo de ligação ao alvo e a outra molécula. Esta comparação pode ser feita como descrito acima em uma avaliação de KD ou Ki. Outra molécula usada em tal comparação pode ser qualquer molécula não sendo a molécula alvo. Preferencialmente outra molécula não é idêntica à molécula alvo. Preferencialmente, a molécula alvo não é um fragmento da molécula alvo.

[000127] O KD de um anticorpo da presente invenção pode ser menos de 0,8 nM, tais como menos de 0,7 nM, tais como menos de 0,6 nM, tais como menos de 0,5 nM, tais como menos de 0,4 nM, tais como menos de 0,3 nM, tais como menos de 0,2 nM, tais como menos de 0,1 nM, tais como menos de 0,05 nM, tais como menos de 0,025 nM, tais como menos de 0,015 nM, tal como entre 0,015 nM e 0 nM.

[000128] A outra molécula usada para determinar que a ligação específica pode estar não relacionada em estrutura ou função ao alvo. Por exemplo, outra molécula pode ser um material não relacionado ou material acompanhante no ambiente.

[000129] A outra molécula usada para determinar que a ligação específica pode ser outra molécula envolvida na mesma via in vivo que

a molécula alvo. Por exemplo, onde o alvo é TFPI ou um fragmento ou variante do mesmo, outra molécula usada para a comparação pode ser uma proteína que é parte da cascata de coagulação sanguínea. Assegurando que o anticorpo da invenção tem especificidade de TFPI sobre outra tal molécula, a reatividade cruzada in vivo não desejada pode ser evitada.

[000130] A outra molécula usada para a comparação pode estar relacionada à molécula alvo. Por exemplo, onde é desejado identificar um anticorpo que se liga somente a um epitopo específico, outra molécula para comparação pode ser uma molécula de TFPI na qual aquele epitopo está faltando ou rompido. Outra molécula usada para comparação pode ser dessa forma outra molécula alvo que é diferente da molécula alvo ligada ao anticorpo em questão.

[000131] O anticorpo da invenção pode conservar a capacidade de ligação a algumas moléculas que estão relacionadas à molécula alvo. Por exemplo, um TFPI humano maduro inteiro pode ser usado como alvo, mas o anticorpo também pode ser capaz de ligação às formas, por exemplo, imaturas de TFPI humano, fragmentos ou formas truncadas de TFPI humano, TFPI que está ligado à lipoproteína ou a uma célula ou TFPI de outras espécies, tais como outro TFPI mamífero.

[000132] Alternativamente, o anticorpo da invenção pode ter especificidade de uma molécula alvo particular. Por exemplo, pode ligar-se a uma molécula alvo como descrito neste pedido, mas pode não se ligar, ou pode se ligar com afinidade significativamente reduzida a uma molécula alvo diferente como descrito neste pedido. Por exemplo, um TFPI humano maduro completo pode ser usado como alvo, mas o anticorpo que se liga àquele alvo pode ser incapaz de se ligar ou pode se ligar com menor afinidade, por exemplo, às formas imaturas de TFPI humano, fragmentos ou formas truncadas de

TFPI humano, TFPI que está ligado à lipoproteína ou a uma célula ou TFPI de outras espécies, tais como outro TFPI mamífero.

[000133] Um anticorpo da invenção pode ligar-se a TFPI e ao fazê-lo pode inibir uma atividade de TFPI.

[000134] Como explicado acima, TFPI regula para baixo a coagulação sanguínea. Faz isto pela inibição da atividade de FXa e inibição do complexo TF-FVIIa na presença de FXa. A atividade de TFPI que é inibido por um anticorpo da invenção pode ser qualquer uma destas atividades ou quaisquer efeitos a jusante dos mesmos. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode levar a um aumento na coagulação sanguínea, um aumento na presença ou nos níveis do FXa ou uma atividade aumentada de TF-FVIIa. Preferencialmente, um anticorpo da invenção reduz o tempo de coagulação ao contatar com (a) plasma deficiente FVIII humano ou (b) sangue humano inteiro.

[000135] A medida da atividade de TFPI pode compreender a avaliação da atividade do TFPI em inibição de coagulação ou redução de tempo de coagulação em uma amostra de sangue. Por exemplo, tal método pode compreender contato de TFPI com uma amostra do sangue ou um produto sanguíneo, tal como plasma ou soro que compreende fatores de coagulação sanguínea sob condições nas quais a coagulação deve ocorrer, e determinação se a coagulação do sangue é inibida ou o tempo de coagulação é reduzido pela presença do TFPI. O nível da coagulação sanguínea ou tempo de coagulação em tal amostra então pode ser comparaa a este em uma amostra equivalente na qual um anticorpo teste está presente também. Se o nível de coagulação for aumentado ou tempo de coagulação for reduzido na amostra de anticorpo, isto sugere que o anticorpo esteja inibindo a atividade de TFPI na amostra.

[000136] Coagulação sanguínea pode ser detectada pela busca da coagulação do próprio sangue, do plasma, ou para uma ou mais

características da cascata de coagulação que estão a jusante do ponto da ação de TFPI. Por exemplo, o método pode avaliar níveis de FXa ou ativação de TF-FVIIa na amostra.

[000137] Vários outros métodos para avaliar coagulação sanguínea e tempo de coagulação são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, qualquer efeito de um anticorpo no tempo de coagulação sanguínea pode ser avaliado usando uma análise de tempo de protrombina diluída (análise dPT) como descrito nos exemplos. Resumidamente, o plasma humano é contatado com tromboplastina humana. O tempo que leva para o plasma coagular é medido na presença e na ausência do anticorpo teste. Um controle positivo pode ser usado em tal análise, tal como a adição de FVIIa (NovoSeven ®) que esperaria reduzir o tempo de coagulação. Um anticorpo da invenção deve ser capaz de reduzir o tempo de coagulação em tal método. Preferencialmente, um anticorpo da invenção deve ser capaz de reduzir o tempo de coagulação de uma maneira dose-dependente.

[000138] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de inibir TFPI em um ensaio de coágulo baseado em plasma, tal como uma análise dPT, significativamente melhor do que qualquer um ou mais dos anticorpos monoclonais seguintes comercialmente disponíveis: mAb0281 (Ab systems) e/ou mAb4904 (American Diagnostica) e/ou mAb2974 (R&D systems) e/ou mAb29741 (R&D systems).

[000139] Tromboelastografia pode ser usada para avaliar a cinética de formação de coágulo e fibrinólise em amostras de sangue total. A capacidade de um anticorpo de reduzir o tempo de coagulação ou estimular a coagulação sanguínea pode ser dessa forma similarmente avaliada em uma amostra de sangue total pela comparação do tempo que leva para a formação de coágulo na presença e na ausência do anticorpo.

[000140] Métodos para avaliar os efeitos funcionais de um anticorpo

da invenção podem ser dessa forma realizados in vitro. Tais métodos são preferencialmente realizados em amostras de sangue ou plasma humano. Tais amostras podem ser sangue ou plasma humano normal ou podem ser deficientes, ou suplementados com um ou mais fatores envolvidos na coagulação sanguínea. Por exemplo, estes métodos podem ser realizados usando sangue total humano normal, plama humano normal ou plasma deficiente em FVIII ou sangue total. O sangue ou plasma deficiente em FVIII podem ser gerados pelo contato de um sangue adequado ou amostra plasmática com anticorpo de neutralização anti-FVIII. Tais métodos in vitro podem ligar análises de interação ou análises de neutralização de TFPI, tais como aquelas descritas nos exemplos 6 a 11.

[000141] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de inibição de TFPI associado à plaqueta.

[000142] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de inibição de TFPI solúvel.

[000143] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de inibição de TFPI ligado à lipoproteína.

[000144] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de inibição de TFPI ligado à célula, tal como TFPI que está ligado a células endoteliais.

[000145] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de ligação a TFPI tal que FXa conserve sua atividade em pelo menos 91%, tais como pelo menos 92%, tais como pelo menos 93%, tais como pelo menos 94%, tais como pelo menos 95%, tais como pelo menos 96%, tais como pelo menos 97%, tais como pelo menos 98%, tais como pelo menos 99%, tais como 99 a 100% como medido em um ensaio de inibição de FXa.

[000146] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de neutralização da inibição de TFPI de FVIIa/TF/FXa ligado à

membrana, quando TFPI é saturado com o dito anticorpo, em pelo menos 55%, tais como pelo menos 60%, tais como pelo menos 65%, tais como pelo menos 70%, tais como pelo menos 75%, tais como pelo menos 80%, tais como pelo menos 85%, tais como pelo menos 90%, tais como pelo menos 95%, tais como até 100%, tais como 100%, como medido em um ensaio de inibidor de FVIIa/TF/FXa.

[000147] Preferencialmente, um anticorpo da invenção é capaz de redução do tempo de coagulação e/ou estimulação da coagulação sanguínea em uma amostra de (a) sangue total humano, (b) plasma humano, (c) sangue total humano deficiente em FVIII, (d) plasma humano deficiente em FVIII, (e) sangue total humano deficiente em FIX ou (f) plasma humano deficiente em FIX.

[000148] Métodos para determinar a capacidade de um anticorpo de estimular coagulação sanguínea ou reduzir o tempo de coagulação também podem ser realizados in vivo. Por exemplo, estudos in vivo podem ser realizados em coelhos hemofílicos transientes como descrito nos exemplos. Resumidamente, os coelhos podem ser tornados hemofílicos transientes pela administração de anticorpo anti-FVIII. O anticorpo teste então pode ser administrado e tempo de sangramento de cutícula e/ou número de plaquetas avaliado. Uma redução do tempo de sangramento de cutícula na presença de um anticorpo teste indica que o anticorpo é capaz de redução do tempo de coagulação e estimulação de coagulação sanguínea. Um anticorpo que tem tal efeito, por isso, pode ser um anticorpo da presente invenção.

[000149] O anticorpo da presente invenção pode ser capaz de ligação ao domínio K2 de TFPI tal que a porcentagem de TFPI livre em um indivíduo seja reduzida a menos de 30%, tal como menos de 29%, tal como menos de 28%, tal como menos de 27%, tal como menos de 26%, tal como menos de 25%, tal como menos de 24%, tal como

menos de 23%, tal como menos de 22%, tal como menos de 21%, tal como menos de 20%, tal como menos de 19%, tal como menos de 18%, tal como menos de 17%, tal como menos de 16%, tal como menos de 15%, tal como menos de 14%, tal como menos de 13%, tal como menos de 12%, tal como menos de 11%, tal como menos de 10%, tal como menos de 9%, tal como menos de 8%, tal como menos de 7%, tal como menos de 6%, tal como menos de 5%, tal como menos de 4%, tal como menos de 3%, tal como menos de 2%, tal como menos de 1%, tal como 0%.

[000150] Além disso, o anticorpo da presente invenção pode ser capaz de ligação ao domínio K2 de TFPI tal que a quantidade de TFPI livre em um indivíduo seja reduzida durante os 28 primeiros dias, tal como durante os 27 primeiros dias, tal como durante os 26 primeiros dias, tal como durante os 25 primeiros dias, tal como durante os 24 primeiros dias, tal como durante os 23 primeiros dias, tal como durante os 22 primeiros dias, tal como durante os 21 primeiros dias, tal como durante os 20 primeiros dias, tal como durante os 19 primeiros dias, tal como durante os 18 primeiros dias, tal como durante os 17 primeiros dias, tal como durante os 16 primeiros dias, tal como durante os 15 primeiros dias, tal como durante os 14 primeiros dias, tal como durante os 13 primeiros dias, tal como durante os 12 primeiros dias, tal como durante os 11 primeiros dias, tal como durante os 10 primeiros dias, tal como durante os 9 primeiros dias, tal como durante os 8 primeiros dias, tal como durante os 7 primeiros dias, tal como durante os 6 primeiros dias, tal como durante os 5 primeiros dias, tal como durante os 4 primeiros dias, tal como durante os 3 primeiros dias, tal como durante os 2 primeiros dias, tal como durante o primeiro dia após administração do dito anticorpo monoclonal ao dito indivíduo.

[000151] Um anticorpo da presente invenção também pode não levar a redução significante em números de plaquetas. Em particular, um

anticorpo da invenção pode ser capaz de redução do tempo de coagulação e/ou estimulação de coagulação sanguínea em uma amostra de (a) sangue total humano, (b) plasma humano, (c) sangue total humano deficiente em FVIII (d) plasma humano deficiente em FVIII, (e) sangue total humano deficiente em FIX ou (f) plasma humano deficiente em FIX, ou em um animal in vivo, sem levar a qualquer redução significante em números de plaquetas. Números de plaquetas podem ser avaliados na mesma amostra ou animal como os outros efeitos discutidos acima, ou podem ser avaliados separadamente. Por exemplo, números de plaquetas podem ser avaliados em uma amostra de sangue, tal como uma amostra do sangue obtido de um paciente ou animal experimental. Números de plaquetas podem ser avaliados após administração do anticorpo a um coelho hemofílico transiente como descrito acima. Os anticorpos da invenção podem ser capazes de redução do tempo de sangramento de cutícula sem levar a uma redução simultânea nos números de plaquetas, como exemplificado por estudos in vivo em coelhos hemofílicos transientes. Uma modificação nos números de plaquetas pode ser avaliada pela comparação dos números de plaquetas antes e após administração do anticorpo ou pela comparação dos números de plaquetas entre uma amostra ou o animal tratado com o anticorpo de interesse e uma amostra controle ou animal não tratado com aquele anticorpo. Um anticorpo da presente invenção pode ser capaz de ligação ao domínio K2 de TFPI, tal que o tempo de coagulação in vivo de um indivíduo é reduzido e a contagem de plaqueta do dito indivíduo não é significativamente reduzida. Por exemplo, a contagem de plaquetas do dito indivíduo pode não cair a aproximadamente 80%, tal como aproximadamente 75%, tal como aproximadamente 70%, tal como aproximadamente 65%, tal como aproximadamente 60%, tal como aproximadamente 55%, tal como aproximadamente 50%, tal como

aproximadamente 45%, tal como aproximadamente 40%, tal como aproximadamente 35%, tal como aproximadamente 30%, tal como aproximadamente 25% da contagem de plaquetas original. Preferencialmente, não haverá diferença ou diferença estatisticamente significante nos números de plaquetas ao fazer tais comparações. Isto é, o anticorpo da invenção não terá causado redução nos números de plaquetas.

[000152] O termo "anticorpo" como referido neste pedido inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação a antígeno (isto é, "porção de ligação a antígeno") ou cadeias únicas dos mesmos. Um anticorpo se refere a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (HC) e duas cadeias leves (LC) interligadas por ligações dissulfeto, ou porção de ligação a antígeno dos mesmos. Cada cadeia pesada é compreendida por uma região variável da cadeia pesada (abreviada neste pedido como VH) e uma região constante da cadeia pesada (CH). Cada cadeia leve é compreendida por uma região variável da cadeia leve (abreviada neste pedido como VL) e uma região constante da cadeia leve (CL). As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões da hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), entremeadas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões conservadas (FR). As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

[000153] O termo "região de determinação de complementaridade" ou "região hipervariável" quando usado neste pedido se refere aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela

ligação ao antígeno. As regiões de determinação de complementaridade ou "CDRs" são geralmente compreendidas por resíduos de aminoácidos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) e 89 a 97 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 31 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) e 95 a 102 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91 a 3242) e/ou aqueles resíduos de uma "alça hipervariável" (resíduos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) e 91 a 96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) e 96 a 101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987; 196:901-917). Tipicamente, a numeração de resíduos de aminoácidos nesta região é realizada pelo método descrito em Kabat et al., supra. As frases, tais como "posição de Kabat", "resíduo de Kabat", e "de acordo com Kabat" neste pedido se refere a este sistema de numeração de domínios variáveis da cadeia pesada ou domínios variáveis da cadeia leve. Usando a numeração de sistema de Kabat, a sequência de aminoácidos linear real de um peptídeo pode conter menos ou aminoácidos adicionais correspondentes a uma redução, ou inserção, uma FR ou CDR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável da cadeia pesada pode incluir inserções de aminoácido (resíduo 52a, 52b e 52c de acordo com Kabat) após resíduo 52 da CDR H2 e resíduos inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b, e 82c, etc. de acordo com Kabat) após resíduo de FR 82 da cadeia pesada. A numeração de Kabat de resíduos pode ser determinada para um dado anticorpo pelo alinhamento em regiões da homologia da sequência do anticorpo com a sequência numerada de um Kabat "padrão".

[000154] O termo "região de estrutura" ou resíduos de "FR" se refere àqueles resíduos de aminoácidos VH ou VL que não estão dentro das CDRs, como definido neste pedido.

[000155] Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal. Em uma modalidade, um anticorpo da invenção é um anticorpo monoclonal. Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo quimérico, um anticorpo enxertado por CDR, um anticorpo humano ou humanizado ou uma porção de ligação a antígeno de qualquer um dos mesmos. Para a produção tanto de anticorpos monoclonais como de policlonais, o animal experimental é um mamífero adequado tal como, mas não restrito a uma cabra, coelho, rato ou camundongo.

[000156] Anticorpos policlonais são anticorpos que são derivados de linhagens de células B diferentes. Um anticorpo policlonal pode compreender uma mistura de moléculas de imunoglobulina diferentes que são direcionadas contra um antígeno específico. O anticorpo policlonal pode compreender uma mistura de moléculas de imunoglobulina diferentes que se ligam a um ou mais epitopos diferentes dentro de uma molécula de antígeno. Anticorpos policlonais podem ser produzidos por métodos regulares, tais como a imunização de um animal adequado, com o antígeno de interesse. O sangue pode ser posteriormente removido do animal e a fração de imunoglobulina purificada.

[000157] Anticorpos monoclonais são moléculas de imunoglobulina que são idênticas entre si e têm uma especificidade de ligação única e afinidade para um epitopo particular. Anticorpos monoclonais (mAbs) da presente invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo a metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização celular somática padrão de Kohler e Milstein (1975) Nature 256: 495, ou transformação viral ou oncogênica de linfócitos B. O sistema animal preferencial para preparação de hibridomas é o sistema murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem

estabelecido. Protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma murino) e procedimentos de fusão também são conhecidos.

[000158] Para gerar hibridomas que produzem anticorpos monoclonais da invenção, esplenócitos e/ou células de linfonodo de camundongos imunizados podem ser isolados e fusionados a uma linhagem celular imortalizada apropriada, tal como uma linhagem celular de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser rastreados para a produção de anticorpos específicos para o antígeno. Os hibridomas que secreta anticorpo podem ser replaqueados, rastreados novamente, e se ainda positivos para a IgG adequada, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes por limitação de diluição. Os subclones estáveis então podem ser cultivados in vitro para gerar pequenas quantidades do anticorpo em meio de cultura tecidual para caracterização.

[000159] O termo "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que conservam a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno, tal como TFPI ou outra proteína alvo como descrito neste pedido. Foi mostrado que a função de ligação a antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo inteiro. Exemplos de fragmentos de ligação englobados dentro do termo "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo incluem um fragmento Fab, um fragmento F(ab')2, um fragmento Fab', um fragmento Fd, um fragmento Fv, um fragmento dAb e uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR). Anticorpos da cadeia única, tais como scFv e anticorpos da cadeia pesada, tais como VHH e anticorpos de camelo também são destinados a serem englobados dentro do termo "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo podem ser

obtidos usando técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica, e os fragmentos podem ser rastreados para a utilidade da mesma maneira que anticorpos intactos.

[000160] Um anticorpo da invenção pode ser preparado, expresso, criado ou isolado por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para os genes de imunoglobulina de interesse ou um hibridoma preparado a partir do mesmo, (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo de interesse, por exemplo, de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo recombinante, combinatória, e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolve o splicing de sequências gênicas de imunoglobulina a outras sequências de DNA.

[000161] Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado. O termo "anticorpo humano", como usado neste pedido, é destinado a incluir anticorpos tendo regiões variáveis nas quais tanto a região de estrutura como as regiões de CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese randômica ou sítio-específica in vitro ou por mutação somática in vivo). Entretanto, o termo "anticorpo humano", como usado neste pedido, não é destinado a incluir anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outras espécies mamíferas, tais como um camundongo, foram enxertadas

para sequências de região de estrutura humana.

[000162] Tal anticorpo humano pode ser um anticorpo monoclonal humano. Tal anticorpo monoclonal humano pode ser produzido por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene da cadeia pesada humana e um transgene da cadeia leve fusionado a uma célula imortalizada.

[000163] Anticorpos humanos podem ser isolados de bibliotecas de sequência contruídas em seleções de sequências de linhagem germinativa humana mais diversificadas com a diversidade de sequência natural e sintética.

[000164] Anticorpos humanos podem ser preparados pela imunização in vitro de linfócitos humanos seguidos pela transformação dos linfócitos com o vírus Epstein-Barr.

[000165] O termo "derivados de anticorpo humanos" se refere a qualquer forma modificada do anticorpo humano, por exemplo, um conjugado do anticorpo e outro agente ou anticorpo.

[000166] O termo "anticorpo humanizado" é destinado a referir-se a um anticorpo humano/quimérico não humano que contém uma sequência mínima (regiões de CDR) derivada da imunoglobulina não humana. Anticorpos humanizados são dessa forma imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) no qual os resíduos de uma região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato, coelho, ou primata não humano tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns exemplos, os resíduos de FR da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Um exemplo de tal modificação é a introdução de uma ou mais as chamadas retromutações, tal como é descrita no exemplo 2.

[000167] Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar ainda o desempenho do anticorpo. Em geral, um anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todos ou substancialmente todos os resíduos de FR são aqueles de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também pode compreender opcionalmente pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana.

[000168] Anticorpos da invenção podem ser testados para ligação à proteína alvo por, por exemplo, ELISA padrão ou Western blotting. Um ensaio de ELISA também pode ser usado para rastrear para hibridomas que mostram reatividade positiva com a proteína alvo. A especificidade de ligação de um anticorpo também pode ser determinada pelo monitoramento da ligação do anticorpo a células que expressam a proteína alvo, por exemplo, por citometria de fluxo.

[000169] A especificidade de um anticorpo da invenção da proteína alvo pode ser ainda estudada pela determinação se o anticorpo se liga a outras proteínas. Por exemplo, onde é desejado produzir um anticorpo que especificamente se liga a TFPI ou a uma parte particular, por exemplo, epitopo, de TFPI, a especificidade do anticorpo pode ser avaliada pela determinação se o anticorpo também se liga a outras moléculas ou formas modificadas de TFPI que não têm a parte de interesse.

[000170] Como explicado acima, os anticorpos da invenção podem modificar a atividade de TFPI. Anticorpos tendo as propriedades de

ligação necessárias dessa forma podem ser ainda testados para determinar seus efeitos sobre a atividade de TFPI. Dessa forma, os métodos podem ser usados para identificar anticorpos adequados que são capazes da ligação a TFPI e é capaz de modificação, e em particular, redução, sua atividade.

[000171] Uma vez que um anticorpo adequado foi identificado e selecionado, a sequência de aminoácidos do anticorpo pode ser identificada por métodos conhecidos na técnica. Os genes que codificam o anticorpo podem ser clonados usando iniciadores específicos e/ou degenerados. O anticorpo pode ser recombinantemente produzido por métodos de rotina.

[000172] Um "polipeptídeo" é usado neste pedido em seu sentido mais amplo para referir-se a um composto de dois ou mais aminoácidos de subunidade, análogos de aminoácido, ou outros peptideomiméticos. O termo "polipeptídeo" dessa forma inclui sequências peptídicas curtas e também polipeptídeos e proteínas mais longos. Como usado neste pedido, o termo "aminoácido" pode referir-se a aminoácidos naturais e/ou não naturais ou sintéticos, isômeros óticos D e/ou L, e análogos de aminoácidos e peptideomiméticos.

[000173] Os presentes inventores identificaram um anticorpo murino como descrito nos exemplos. Este anticorpo é referido neste pedido como TFPI-4F36A1B2 (alternativamente, 4F36 ou MuTFPI4F36). A presente invenção engloba este anticorpo, variantes e fragmentos dos mesmos - incluindo anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados - que conservam uma ou mais atividades do anticorpo murino e que também são descritos nos exemplos. As atividades deste anticorpo incluem a capacidade de ligar-se a TFPI, a capacidade de ligar-se a posições específicas na molécula de TFPI e a capacidade de inibir a atividade de TFPI.

[000174] Um fragmento adequado ou a variante deste anticorpo

conservarão a capacidade de ligar-se a TFPI. Conservará preferencialmente a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI. Conservará preferencialmente a capacidade de ligar-se especificamente ao mesmo epitopo ou similar ou à região da molécula de TFPI como o anticorpo (MuTFPI4F36) do qual é derivado. Conservará preferencialmente uma ou mais funções adicionais do anticorpo do qual é derivado, tais como a capacidade de inibir a atividade de TFPI ou a capacidade de reduzir o tempo de coagulação, opcionalmente sem levar a uma redução nos números de plaquetas.

[000175] "Fragmentos" de polipeptídeo ou anticorpo de acordo com a invenção podem ser produzidos por truncamento, por exemplo, pela remoção de um ou mais aminoácidos das extremidades N e/ou C-terminais de um polipeptídeo. Até 10, até 20, até 30, até 40 ou mais aminoácidos podem ser removidos do N e/ou C terminal deste modo. Fragmentos também podem ser gerados por uma ou mais deleções internas.

[000176] Um anticorpo da invenção pode ser, ou pode compreender, um fragmento do anticorpo MuTFPI4F36 ou uma variante do mesmo. O anticorpo da invenção pode ser ou pode compreender uma porção de ligação a antígeno deste anticorpo ou uma variante do mesmo como discutido ainda acima. Por exemplo, o anticorpo da invenção pode ser um fragmento Fab deste anticorpo ou uma variante do mesmo ou pode ser um anticorpo de cadeia única derivado deste anticorpo ou uma variante do mesmo.

[000177] As sequências de aminoácidos das cadeias leves e pesadas do anticorpo MuTFPI4F36 são dadas nas SEQ ID NOs: 6 e 10 respectivamente. As sequências de aminoácidos de cadeias VL e VH do anticorpo MuTFPI4F36 são dadas nas SEQ ID NOs: 4 e 8 respectivamente. As sequências de aminoácidos das cadeias leves e pesadas de um anticorpo humanizado, HzTFPI4F36, são dadas nas

SEQ ID NOs: 21 e 24, respectivamente. As sequências de aminoácidos de cadeias VL e VH do HzTFPI4F36 são dadas nas SEQ ID NOs: 15 e 18, respectivamente.

[000178] Um anticorpo da invenção pode compreender a sequência de aminoácidos da cadeia leve MuTFPI4F36 mostrada na SEQ ID NO: 6 ou um fragmento ou variante da mesma. Um anticorpo pode compreender adicionalmente ou alternativamente a sequência de aminoácidos da cadeia pesada MuTFPI4F36 mostrada na SEQ ID NO: 10 ou um fragmento ou variante da mesma como descrito neste pedido.

[000179] Um anticorpo da invenção pode compreender a sequência de aminoácidos VL de SEQ ID No: 4, ou um fragmento ou variante da mesma. Um anticorpo da invenção pode compreender a sequência de aminoácidos VH da SEQ ID No: 8, ou um fragmento ou variante da mesma. Um anticorpo da invenção pode compreender tanto (a) sequência de aminoácidos VL de SEQ ID No: 4, ou um fragmento ou variante da mesma quanto (b) a sequência de aminoácidos VH de SEQ ID No: 8, ou um fragmento ou variante da mesma.

[000180] Um anticorpo da invenção pode compreender um fragmento de um das sequências de aminoácidos VL ou VH mostradas na Figura 2. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode compreender um fragmento de pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 18, pelo menos 20 ou pelo menos 25 aminoácidos consecutivos de SEQ ID No: 4 ou 8. Tal fragmento conservará preferencialmente uma ou mais das funções discutidas acima, tais como a capacidade de se ligar a TFPI.

[000181] Um fragmento adequado ou variante de qualquer uma destas sequências VH ou VL conservará a capacidade de se ligar a TFPI. Conservará preferencialmente a capacidade de ligar

especificamente a TFPI. Conservará preferencialmente a capacidade de se ligar especificamente ao mesmo epitopo ou similar ou a região da molécula de TFPI como o anticorpo (MuTFPI4F36) do qual é derivado. Conservará preferencialmente uma ou mais funções adicionais do anticorpo do qual é derivado, tais como a capacidade de inibir a atividade de TFPI ou a capacidade de reduzir o tempo de coagulação, opcionalmente sem levar a uma baixa em números de plaquetas.

[000182] Um fragmento adequado ou sequência variante VL conservará preferencialmente os aminoácidos nas posições E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 e F99 na SEQ ID NO: 4. Um fragmento adequado ou sequência variante VH conservará preferencialmente os aminoácidos nas posições N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 e D106 na SEQ ID NO: 8. Um fragmento adequado ou anticorpo variante conservará preferencialmente os aminoácidos nas posições E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 e F99 na SEQ ID NO: 4 e os aminoácidos nas posições N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 e D106 na SEQ ID NO: 8. Como identificado na Figura 3, estes são os resíduos nas sequências da cadeia leves e pesadas MuTFPI4F36 que têm um átomo pesado dentro de uma distância de 4 A de um átomo pesado quando MuTFPI4F36 está ligado ao domínio K2 de TFPI.

[000183] Um anticorpo da invenção pode compreender uma região da CDR do anticorpo específico identificado neste pedido, tal como uma região da CDR de dentro da SEQ ID NO: 4 ou 8. Tal anticorpo conservará preferencialmente a capacidade de ligar-se a TFPI como descrito neste pedido. Por exemplo, como mostrado na Figura 3, usando a definição de Kabat, as sequências de CDR dentro da cadeia leve de MuTFPI4F36 podem ser identificadas nos aminoácidos 24 a 39, 55 a 61 e 94 a 102 da SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 6. As

sequências de CDR dentro da cadeia pesada de MuTFPI4F36 podem ser identificadas nos aminoácidos 31 a 35, 50 a 66 e 99 a 110 da SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 10. Um anticorpo da invenção pode compreender uma ou mais das sequências de CDR mostradas na Figura 3. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode compreender uma, duas ou todas as três sequências de aminoácidos mostradas nos resíduos 24 a 39, 55 a 61 e 94 a 102 da SEQ ID NO: 6. Um anticorpo da invenção pode compreender alternativamente ou adicionalmente uma, duas ou todas as três sequências de aminoácidos mostradas nos resíduos 31 a 35, 50 a 66 e 99 a 110 da SEQ ID NO: 10. Um anticorpo da invenção pode compreender as seis sequências de aminoácidos mostradas nos resíduos 24 a 39, 55 a 61 e 94 a 102 da SEQ ID NO: 6 e 31 a 35, 50 a 66 e 99 a 110 da SEQ ID NO: 10.

[000184] Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo humanizado, tal como o anticorpo neste pedido referido como HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021). Tal anticorpo pode compreender uma ou mais regiões de CDR de dentro da SEQ ID NO: 15 ou 18.

[000185] A cadeia pesada de um anticorpo de acordo com a invenção pode compreender uma sequência da CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO: 18, em que um destes aminoácidos pode ser substituído por um aminoácido diferente.

[000186] A cadeia pesada de um anticorpo de acordo com a invenção pode compreender uma sequência da CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000187] A cadeia pesada de um anticorpo de acordo com a invenção pode compreender uma sequência da CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido

diferente.

[000188] A cadeia leve de um anticorpo de acordo com a invenção pode compreender uma sequência da CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000189] A cadeia leve de um anticorpo de acordo com a invenção pode compreender uma sequência da CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000190] A cadeia leve de um anticorpo de acordo com a invenção pode compreender uma sequência da CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000191] Mais particularmente, um anticorpo da invenção pode ter uma cadeia pesada compreendendo:

- uma sequência da CDR1 que, por sua vez, compreende os aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18; e
- uma sequência da CDR2 que, por sua vez, compreende os aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18; e
- uma sequência da CDR3 que, por sua vez, compreende os aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18.

Um anticorpo da invenção pode ter uma cadeia leve compreendendo:

- uma sequência da CDR1 que, por sua vez, compreende os aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15; e
- uma sequência da CDR2 que, por sua vez, compreende os aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15; e

- uma sequência da CDR3 que, por sua vez, compreende os aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15.

[000192] Um anticorpo da invenção pode compreender qualquer combinação das regiões de CDR acima mencionadas.

[000193] Mais particularmente, a região de estrutura 2 (FR2) da cadeia pesada de um anticorpo da invenção pode compreender aminoácidos:

- T, na posição correspondente à posição 40,
- E, na posição correspondente à posição 42,
- R, na posição correspondente à posição 44 e
- A, na posição correspondente à posição 49

da SEQ ID NO: 18.

[000194] Alternativamente, a dita FR2 da cadeia pesada pode compreender os aminoácidos 36 a 49 da SEQ ID NO: 18.

[000195] Um anticorpo da invenção pode compreender qualquer um dos seguintes:

- a sequência de aminoácidos VL da SEQ ID NO: 15.
- A sequência de aminoácidos VH da SEQ ID NO: 18.
- SEQ ID NOs: 15 e 18.
- A sequência de aminoácidos da cadeia leve da SEQ ID NO: 21.
- A sequência de aminoácidos da cadeia pesada da SEQ ID NO: 24.
- SEQ ID NOs: 21 e 24.

[000196] Um anticorpo da invenção pode ser alternativamente ou pode compreender uma variante de uma destas sequências específicas tal variante do anticorpo MuTFPI4F36 ou uma variante de HzTFPI4F36. Por exemplo, uma variante pode ser uma substituição, deleção ou variante de adição de qualquer uma das sequências de aminoácidos acima mencionadas.

[000197] Uma variante de acordo com a presente invenção pode ser um anticorpo que não compreende:

- N, na posição correspondente à posição 31 da região da CDR1 da SEQ ID NO: 18;
- R, na posição correspondente à posição 53;
- S, na posição correspondente à posição 54;
- S, na posição correspondente à posição 56;
- Y, na posição correspondente à posição 57;
- Y, na posição correspondente à posição 59;
- F, na posição correspondente à posição 60;
- P, na posição correspondente à posição 61;
- D, na posição correspondente à posição 62; e
- Q, na posição correspondente à posição 65;

da região da CDR2 DE SEQ ID NO: 18.

- Y, na posição correspondente à posição 102;
- D, na posição correspondente à posição 103; e
- D, na posição correspondente à posição 106;

da região da CDR3 DE SEQ ID NO: 18.

- E, na posição correspondente à posição 31;
- S, na posição correspondente à posição 32;
- D, na posição correspondente à posição 33; e
- Y, na posição correspondente à posição 37;

da região da CDR1 DE SEQ ID NO: 15.

- A, na posição correspondente à posição 96;
- T, na posição correspondente à posição 97;
- H, na posição correspondente à posição 98; e
- F, na posição correspondente à posição 99;

da região da CDR3 DE SEQ ID NO: 15.

[000198] Um anticorpo variante pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, até 10, até 20, até 30 ou mais substituições e/ou deleções e/ou inserções

de aminoácido das sequências específicas e fragmentos discutidos acima. Variantes de "deleção" podem compreender a deleção de aminoácidos individuais, deleção de pequenos grupos de aminoácidos tais como 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos, ou deleção de maiores regiões de aminoácidos, tais como a deleção de domínios de aminoácidos específicos ou outros atributos. Variantes de "inserção" podem compreender a inserção de aminoácidos individuais, inserção de pequenos grupos de aminoácidos tais como 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos, ou inserção de maiores regiões de aminoácidos, tais como a inserção de domínios de aminoácidos específicos ou outros atributos. Variantes de "substituição" preferencialmente envolvem a substituição de um ou mais aminoácidos com o mesmo número de aminoácidos e criação de substituições de aminoácido conservativas. Por exemplo, um aminoácido pode ser substituído por um aminoácido alternativo tendo propriedades similares, por exemplo, outro aminoácido básico, outro aminoácido acídico, outro aminoácido neutro, outro aminoácido carregado, outro aminoácido hidrofílico, outro aminoácido hidrofóbico, outro aminoácido polar, outro aminoácido aromático ou outro aminoácido alifático. Algumas propriedades dos 20 aminoácidos principais que podem ser usados para selecionar substituintes adequados são como se segue:

Ala	alifático, hidrofóbico, neutro	Met	hidrofóbico, neutro
Cys	polar, hidrofóbico, neutro	Asn	polar, hidrofílico, neutro
Asp	polar, hidrofílico, carregado (-)	Pro	hidrofóbico, neutro
Glu	polar, hidrofílico, carregado (-)	Gln	polar, hidrofílico, neutro
Phe	aromático, hidrofóbico, neutro	Arg	polar, hidrofílico, carregado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrofílico, neutro

His	aromático, polar, hidrofílico, carregado (+)	Thr	polar, hidrofílico, neutro
Ile	alifático, hidrofóbico, neutro	Val	alifático, hidrofóbico, neutro
Lys	polar, hidrofílico, carregado (+)	Trp	aromático, hidrofóbico, neutro
Leu	alifático, hidrofóbico, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrofóbico

[000199] "Derivados" ou "variantes" preferenciais incluem aqueles em que em vez do aminoácido que ocorre naturalmente, o aminoácido que aparece na sequência é um análogo estrutural do mesmo. Aminoácidos usados nas sequências também podem ser derivatizados ou modificados, por exemplo, marcados, fornecendo a função do anticorpo não é significativamente adversamente afetada.

[000200] Substituições podem ser, mas não são limitadas a, substituições conservativas.

[000201] Derivados e variantes como descrito acima podem ser preparados durante a síntese do anticorpo ou pela modificação de montagem, ou quando o anticorpo está em forma recombinante usando as técnicas conhecidas de mutagênese sítio-dirigida, mutagênese randômica, ou clivagem enzimática e/ou ligação de ácidos nucleicos.

[000202] Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza moléculas multiespecíficas que compreendem um anticorpo anti-TFPI, ou fragmento do antígeno do mesmo, da invenção. Tais moléculas multiespecíficas incluem moléculas biespecíficas que compreendem pelo menos uma primeira especificidade de ligação de TFPI e uma segunda especificidade de ligação de um segundo epitopo alvo. Um tipo de moléculas biespecíficas são anticorpos biespecíficos como conhecido na técnica. Anticorpos biespecíficos, ou de fato anticorpos

multiespecíficos, podem ser preparados como anticorpos inteiros ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab')2) ou qualquer outro fragmento de ligação a antígeno descrito neste pedido.

[000203] Em um aspecto, presente invenção caracteriza os derivados de anticorpo (ou imunoconjugados), tais como anticorpos anfi-TFPI conjugados ou covalentemente ligados a um segundo agente. O segundo agente pode ser ligado ao anticorpo diretamente ou indiretamente, usando qualquer um de um grande número de métodos disponíveis conhecidos pelo versado na técnica. Por exemplo, um agente pode ser ligado na região de dobradiça do componente de anticorpo reduzido através de formação de ligação dissulfeto, usando interligadores, tais como N-succinil S-propionato (2-piridilditio) (SPDP), ou através de uma porção carboidrato na região Fc do anticorpo.

[000204] Em um aspecto, os anticorpos da invenção podem ser engendrados para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tais como meia-vida sérica, fixação de complemento, ligação de receptor de Fc, estabilidade proteica e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno, ou falta dos mesmos. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais porções químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificado para alterar sua glicosilação, novamente alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo.

[000205] Se desejado, a classe de um anticorpo pode ser "trocada" por técnicas conhecidas. Por exemplo, um anticorpo que foi originalmente produzido como uma molécula de IgM pode ter a classe trocada por um anticorpo IgG. Técnicas de troca de classe também podem ser usadas para converter uma subclasse IgG em outra, por

exemplo: de IgG1 a IgG2 ou IgG4; de IgG2 a IgG1 ou IgG4; ou de IgG4 a IgG1 ou IgG2. A engenharia de anticorpos para gerar as moléculas quiméricas de região constante, pela combinação de regiões de subclasses de IgG diferentes, também pode ser realizada.

[000206] Em uma modalidade, a região de dobradiça de CHI é modificada tal que o número de resíduos de cisteína na região de dobradiça seja alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Esta abordagem é descrita ainda, por exemplo, na Patente Americana No. 5.677.425 por Bodmer et al.

[000207] A região constante pode ser ainda modificada para estabilizar o anticorpo, por exemplo, reduzir o risco de um anticorpo bivalente que se separa em dois fragmentos monovalentes VH-VL. Por exemplo, em uma região constante de IgG4, o resíduo S241 pode ser mutado a um resíduo prolina (P) para permitir a formação de ponte dissulfeto completa na dobradiça (ver, por exemplo, Angal et al., Mol Immunol. 199S; 30:105-8).

[000208] Anticorpos variantes de acordo com a invenção podem ter sequências de aminoácidos que são mais de 60%, ou mais de 65%, ou mais de 70%, ou mais de 75%, ou mais de 80%, preferencialmente mais de 85%, tais como mais de 90%, tais como mais de 95% idênticas a SEQ ID NOs: 4 ou 8, ou fragmentos das mesmas. Outros anticorpos variantes de acordo com a invenção podem ter sequências de aminoácidos que são mais de 60%, ou mais de 65%, ou mais de 70%, ou mais de 75%, ou mais de 80%, preferencialmente mais de 85%, tais como mais de 90%, tais como mais de 95% idênticas a SEQ ID NOs: 15 ou 18, ou um fragmento das mesmas. Este nível de identidade de aminoácido pode ser visto através do comprimento completo da sequência da SEQ ID NO relevante ou sobre uma parte da sequência, tal como através 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200 ou mais aminoácidos, dependendo do tamanho do

polipeptídeo completo.

[000209] Com relação a sequências de aminoácidos, "identidade de sequência" se refere a sequências que têm o valor determinado quando avaliadas usando ClustalW (Thompson et al., 1994, supra) com os seguintes parâmetros:

[000210] Parâmetros de alinhamento aos pares - Método: exato, Matriz: PAM, Penalidade de abertura de lacuna: 10,00, Penalidade de extensão de lacuna: 0,10;

[000211] Múltiplos parâmetros de alinhamento - Matriz: PAM, Penalidade de abertura de lacuna: 10,00, identidade % por retardo: 30, lacunas de extremidade de penalidade: ligado, Distância de separação de lacuna: 0, Matriz negativa: não, Penalidade de extensão de lacuna: 0,20, Penalidades de lacuna específicas para o resíduo: ligado, Penalidades de lacuna hidrofílica: ligado, Resíduos hidrofílicos: GPSNDQEKR. Identidade de sequência em um resíduo particular é destinada a incluir resíduos idênticos que foram simplesmente derivatizados.

[000212] A presente invenção dessa forma fornece anticorpos tendo sequências de aminoácidos VH e VL específicas e variantes e fragmentos dos mesmos que mantém a função ou atividade destes domínios VH e VL.

[000213] Consequentemente, um anticorpo da invenção pode compreender:

(a) uma sequência de aminoácidos de região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 4;

(b) um fragmento de pelo menos 7 aminoácidos de (a) que conserva a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI; ou

(c) uma variante de (a) tendo identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 70% a uma sequência de (a) e conservando a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI.

[000214] Um anticorpo da invenção pode compreender:

(a) uma sequência de aminoácidos de região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 8;

(b) um fragmento de pelo menos 7 aminoácidos de (a) que conserva a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI; ou

(c) uma variante de (a) tendo identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 70% a uma sequência de (a) e conservando a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI.

[000215] Um anticorpo da invenção pode compreender a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 4 e a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 8.

[000216] Um anticorpo da invenção pode compreender:

(a) a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 4 e a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 8;

(b) uma variante de (a) na qual uma ou ambas as sequências de cadeia pesada e de cadeia leve são modificadas tal que compreendam um fragmento de pelo menos 7 aminoácidos da sequência especificada em (a); ou

(c) uma variante de (a) ou (b) na qual uma ou ambas as sequências da cadeia pesada e leve são modificadas tal que tenham identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 70% a uma sequência de (a) ou (b);

em que o anticorpo conserva a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI. O anticorpo também pode conservar uma ou mais funções ou atividades adicionais de um anticorpo da invenção como descritas neste pedido, tais como a capacidade de inibir TFPI ou a capacidade de encurtar o tempo de coagulação, opcionalmente sem levar a uma redução nos números de plaquetas.

[000217] Fragmentos e variantes preferenciais da SEQ ID NO: 4 compreenderão (i) aminoácidos 24 a 39 da SEQ ID NO: 6; e/ou (ii)

aminoácidos 55 a 61 da SEQ ID NO: 6; e/ou (iii) aminoácidos 94 a 102 da SEQ ID NO: 6. Fragmentos e variantes preferenciais da SEQ ID NO: 8 compreenderão aminoácidos (i) 31 a 35 da SEQ ID NO: 10; e/ou (ii) aminoácidos 50 a 66 da SEQ ID NO: 10; e/ou (iii) aminoácidos 99 a 110 da SEQ ID NO: 10.

[000218] Variantes mais preferenciais da SEQ ID NO: 4 compreenderão aminoácidos 31 a 33, 37 e 96 a 99 da SEQ ID NO: 6. Variantes mais preferenciais da SEQ ID NO: 8 compreenderão aminoácidos 31, 53, 54, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 65, 102, 103 e 106 da SEQ ID NO: 10.

[000219] Um anticorpo da invenção pode compreender:

(a) uma sequência de aminoácidos de região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 15;

(b) um fragmento de pelo menos 7 aminoácidos de (a) que conserva a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI; ou

(c) uma variante de (a) tendo identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 70% a uma sequência de (a) e conserva a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI.

[000220] Um anticorpo da invenção pode compreender:

(a) uma sequência de aminoácidos de região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 18;

(b) um fragmento de pelo menos 7 aminoácidos de (a) que conserva a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI; ou

(c) uma variante de (a) tendo identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 70% a uma sequência de (a) e conservando a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI.

[000221] Um anticorpo da invenção pode compreender a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 18.

[000222] Um anticorpo da invenção pode compreender:

(a) a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 15 e a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 18;

(b) uma variante de (a) na qual uma ou ambas das sequências da cadeia pesada e da cadeia leve são modificadas tal que compreendam um fragmento de pelo menos 7 aminoácidos da sequência especificada em (a); ou

(c) uma variante de (a) ou (b) na qual uma ou ambas as sequências da cadeia pesada e da leve são modificadas tal que tenham identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 70% a uma sequência de (a) ou (b);

em que o anticorpo conserva a capacidade de ligar-se especificamente a TFPI. O anticorpo também pode conservar uma ou mais funções ou atividades adicionais de um anticorpo da invenção como descritas neste pedido, tais como a capacidade de inibir TFPI ou a capacidade de reduzir o tempo de coagulação, opcionalmente sem levar a uma redução nos números de plaquetas.

[000223] Como explicado acima, um anticorpo da invenção pode ligar-se ao mesmo epitopo ou região que outro anticorpo da invenção. Dessa forma, será visto que tal anticorpo pode ligar-se ao mesmo epitopo ou região de TFPI como qualquer um dos anticorpos específicos, fragmentos e variantes descritas neste pedido.

[000224] A invenção também se relaciona a polinucleotídeos que codificam anticorpos da invenção. Dessa forma, um polinucleotídeo da invenção pode codificar qualquer anticorpo como descrito neste pedido. Os termos "molécula de ácido nucleico" e "polinucleotídeo" são usados intercambiavelmente neste pedido e referem-se a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, ou análogos dos mesmos. Exemplos não limitantes de polinucleotídeos incluem um gene, um fragmento gênico, RNA mensageiro (mRNA), cDNA,

polinucleotídeos recombinantes, plasmídeos, vetores, DNA isolado de qualquer sequência, RNA isolado de qualquer sequência, sondas de ácidos nucleicos, e iniciadores. Um polinucleotídeo da invenção pode ser fornecido em forma isolada ou purificada.

[000225] Uma sequência de ácido nucleico que "codifica" um polipeptídeo selecionado é uma molécula de ácido nucleico que é transcrita (no caso de DNA) e traduzida (no caso de mRNA) em um polipeptídeo *in vivo* quando colocada no controle de sequências reguladoras apropriadas. Os limites da sequência de codificação são determinados por um códon de partida no terminal 5' (amino) e um códon de parada de tradução no terminal 3' (carbóxi). Para os fins da invenção, tais sequências de ácidos nucleicos podem incluir, mas não são limitadas a, cDNA de mRNA viral, procariótico ou eucariótico, sequências genômicas de DNA viral ou procariótico ou RNA, e até sequências de DNA sintéticas. Uma sequência de terminação de transcrição pode ser localizada 3' à sequência de codificação.

[000226] Em uma modalidade, um polinucleotídeo da invenção compreende uma sequência que codifica uma sequência de aminoácidos VH ou VL como descrito acima. Por exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode codificar um polipeptídeo que compreende a sequência da SEQ ID NO: 4 ou 8, ou uma variante ou fragmento da mesma como descrito acima. Tal polinucleotídeo pode consistir ou compreender uma sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9. Uma sequência polinucleotídica adequada pode ser alternativamente uma variante de uma destas sequências polinucleotídicas específicas. Por exemplo, uma variante pode ser uma substituição, deleção ou variante de adição de qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos acima. Um polinucleotídeo variante pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, até 10, até 20, até 30, até 40, até 50, até 75 ou mais substituições e/ou

deleções de ácidos nucleicos das sequências dadas na listagem de sequência.

[000227] Variantes adequadas podem ser pelo menos 70% homólogas a um polinucleotídeo de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 preferencialmente pelo menos 80 ou 90% e mais preferencialmente pelo menos 95%, 97% ou 99% homólogos a estas. Métodos de medida de homologia são bem conhecidos na técnica e será entendido por aqueles versados na técnica que no presente contexto, homologia é calculada com base na identidade de ácido nucleico. Tal homologia pode existir sobre uma região de pelo menos 15, preferencialmente pelo menos 30, por exemplo, pelo menos 40, 60, 100, 200 ou mais nucleotídeos contíguos. Tal homologia pode existir sobre o comprimento inteiro da sequência de polinucleotídeo não modificada.

[000228] Métodos de medida de homologia ou identidade de polinucleotídeo são conhecidos na técnica. Por exemplo, o Pacote UWGCG fornece o programa BESTFIT que pode ser usado para calcular homologia (por exemplo, usado em suas configurações padrão) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395).

[000229] Os algoritmos de PILEUP e BLAST também podem ser usados para calcular homologia ou alinhar sequências (tipicamente em suas configurações padrão), por exemplo, como descrito em Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10.

[000230] O programa para realização de análise por BLAST está publicamente disponível pelo National Centre for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo envolve o primeiro par de sequências de alto escore de identificação (HSPs) pela identificação das palavras curtas de comprimento W na sequência de questão que combine ou satisfaça algum escore limiar de valor

positivo T quando alinhado com uma palavra de mesmo comprimento em uma sequência de banco de dados. T é referido como o limiar de escore de palavra de vizinhança (Altschul et al, supra). Estes acertos de palavra de vizinhança inicial atuam como sementes para iniciar pesquisas para encontrar HSPs que os contém. Os acertos de palavra são expandidos em ambas as direções ao longo de cada sequência na medida em que o escore de alinhamento cumulativo possa ser aumentado. Extensões dos acertos de palavra em cada direção são suspensas quando: o escore de alinhamento cumulativo vai a zero ou abaixo, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de escore negativo; ou a extremidade de qualquer sequência é alcançada. Os parâmetros de algoritmo de BLAST W, T e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. Os usos de programa BLAST como padrões um comprimento de palavra (W) de 11, a matriz de marcação BLOSUM62 (ver Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, e uma comparação de ambas as fitas.

[000231] O algoritmo BLAST realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências; ver, por exemplo, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787. Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma (P(N)), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma combinação entre duas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos ocorreria por acaso. Por exemplo, uma sequência é considerada similar a outra sequência se a menor probabilidade de soma em comparação com a primeira sequência à segunda sequência for menor que aproximadamente 1, preferencialmente menor que aproximadamente 0,1, mais preferencialmente menor que aproximadamente 0,01, e o mais

preferencialmente menor que aproximadamente 0,001.

[000232] O homólogo pode diferenciar-se de uma sequência no polinucleotídeo relevante por menos de 3, 5, 10, 15, 20 ou mais mutações (cada uma das quais pode ser uma substituição, deleção ou inserção). Estas mutações podem ser medidas sobre uma região de pelo menos 30, por exemplo, pelo menos 40, 60 ou 100 ou mais nucleotídeos contíguos do homólogo.

[000233] Em uma modalidade, uma sequência de variantes pode variar das sequências específicas dadas na sequência que se inclina em virtude da redundância no código genético. O código de DNA tem 4 resíduos ácidos nucleicos primários (A, T, C e G) e usa estes para "soletrar" códons de três letras que representam os aminoácidos, as proteínas codificadas nos genes de um organismo. A sequência linear de códons ao longo da molécula de DNA é traduzida para a sequência linear de aminoácidos na proteína (s) codificada por aqueles genes. O código é altamente degenerado, com 61 códons que codificam para 20 aminoácidos naturais e 3 códons que representam sinais de "parada". Dessa forma, a maioria dos aminoácidos é codificada para por mais de um códon - de fato, vários são codificados por quatro ou mais códons diferentes. Um polinucleotídeo variante da invenção, por isso, pode codificar a mesma sequência polipeptídica que outro polinucleotídeo da invenção, mas pode ter uma sequência de ácido nucleico diferente devido ao uso de códons diferentes para codificar os mesmos aminoácidos.

[000234] "Fragmentos" de polinucleotídeo de acordo com a invenção podem ser criados por truncamento, por exemplo, pela remoção de um ou mais nucleotídeos de uma ou ambas as extremidades de um polinucleotídeo. Até 10, até 20, até 30, até 40, até 50, até 75, até 100, até 200 ou mais aminoácidos podem ser removidos da extremidade 3' e/ou 5' do polinucleotídeo deste modo. Fragmentos também podem

ser gerados por uma ou mais deleções internas. Tais fragmentos podem ser derivados de uma sequência das SEQ ID NOs: 3, 5, 7 e 9 ou pode ser derivado de um polinucleotídeo variante como descrito neste pedido. Preferencialmente tais fragmentos têm entre 30 e 300 resíduos de comprimento, por exemplo, 30 a 300, 30 a 200, 30 a 100, 100 a 200 ou 200 a 300 resíduos. Alternativamente, os fragmentos da invenção podem ser sequências mais longas, por exemplo, compreendendo pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90% de um polinucleotídeo completo da invenção.

[000235] Um anticorpo da invenção pode ser dessa forma produzido ou entregue na forma de um polinucleotídeo que codifica, e é capaz de expressão, dele. Onde o anticorpo compreende duas ou mais cadeias, um polinucleotídeo da invenção pode codificar uma ou mais cadeias de anticorpo. Por exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode codificar uma cadeia leve de anticorpo, uma cadeia pesada de anticorpo ou ambas. Dois polinucleotídeos podem ser fornecidos, um dos quais codifica uma cadeia leve de anticorpo e os outros dos quais codificam a cadeia pesada de anticorpo correspondente. Tal polinucleotídeo ou par de polinucleotídeos podem ser expressos em conjunto tal que um anticorpo da invenção seja gerado.

[000236] Os polinucleotídeos da invenção podem ser sintetizados de acordo com métodos bem conhecidos na técnica, como descrito por meio do exemplo em Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning - A laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

[000237] As moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção podem ser fornecidas na forma de um cassete de expressão que inclui sequências controle, sequências de peptídeo sinal operacionalmente ligadas à sequência inserida, dessa forma permitindo à expressão do anticorpo da invenção in vivo. Estes cassetes de expressão, por sua

vez, são tipicamente fornecidos dentro de vetores (por exemplo, plasmídeos ou vetores virais recombinantes). Tal cassete de expressão pode ser administrado diretamente a um indivíduo hospedeiro. Alternativamente, um vetor compreendendo um polinucleotídeo da invenção pode ser administrado a um indivíduo hospedeiro. Preferencialmente o polinucleotídeo é preparado e/ou administrado usando um vetor genético. Um vetor adequado pode ser qualquer vetor que é capaz de carregar uma quantidade suficiente de informação genética, e permitir a expressão de um polipeptídeo da invenção.

[000238] A presente invenção dessa forma inclui vetores de expressão que compreendem tais sequências polinucleotídicas. Tais vetores de expressão são rotineiramente construídos na técnica da biologia molecular e, por exemplo, podem envolver o uso de DNA plasmidial e iniciadores apropriados, promotores, potencializadores, sequências de peptídeo sinal e outros elementos, tais como, por exemplo, sinais de poliadenilação que podem ser necessários, e que são posicionados na orientação correta, a fim de permitir à expressão de um peptídeo da invenção. Outros vetores adequados seriam evidentes para os versados na técnica. Por meio de exemplo adicional neste sentido referimo-nos a Sambrook et al.

[000239] A invenção também inclui células que foram modificadas para expressar um anticorpo da invenção. Tais células incluem o processo transiente, ou preferencialmente, linhagens celulares eucarióticas superiores estáveis tais como células mamíferas ou células de inseto, células eucarióticas inferiores, tais como levedura ou células procarióticas, tais como células bacterianas. Exemplos particulares de células que podem ser modificadas pela inserção de vetores ou cassetes de expressão que codificam para um anticorpo da invenção incluem células HEK293 mamíferas, CHO, BHK, NSO e de

retina humana. Preferencialmente, a linhagem celular selecionada será aquela que não é somente estável, mas também que permita glicosilação madura e expressão de superfície celular de um polipeptídeo.

[000240] Tais linhagens celulares da invenção podem ser cultivadas usando métodos regulares para produzir um anticorpo da invenção, ou podem ser usadas terapeuticamente ou profilaticamente para entregar anticorpos da invenção a um indivíduo. Alternativamente, polinucleotídeos, cassetes de expressão ou vetores da invenção podem ser administrados a uma célula de um indivíduo ex vivo e a célula então retornada ao corpo do indivíduo.

[000241] Em outro aspecto, a presente invenção fornece composições e formulações compreendendo as moléculas da invenção, tais como os anticorpos, polinucleotídeos, vetores e células descritas neste pedido. Por exemplo, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma ou mais moléculas da invenção, tais como um ou mais anticorpos da invenção, formulada em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[000242] Como usado neste pedido, "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, isotônicos e agentes de retardo de absorção, e similares que são fisiologicamente compatíveis. Preferencialmente, o veículo é adequado para administração parenteral, por exemplo, intravenosa, intramuscular ou subcutânea (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o anticorpo pode ser recoberto com um material para proteger o anticorpo da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar ou desnaturar o anticorpo.

[000243] Veículos preferenciais farmaceuticamente aceitáveis compreendem veículos ou diluentes aquosos. Exemplos de veículos

aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, água tamponada e salina. Exemplos de outros veículos incluem etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e similares), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. Fluidez própria pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário em caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição.

[000244] Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Estas composições também podem conter adjuvantes, tais como conservantes, agentes umidificantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de micro-organismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização, supra, como pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e similares. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disso, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser ocasionada pela inclusão de agentes que retardam absorção, tal como monoestearato de alumínio e gelatina.

[000245] Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de produção e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada à alta concentração de fármaco.

[000246] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do agente ativo (por exemplo, anticorpo) na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como necessário, seguido pela microfiltração de esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas pela incorporação do agente ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. Em caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferenciais de preparação são secagem a vácuo e congelamento a vácuo (liofilização) que produzem um pó do agente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução anteriormente em filtragem estéril do mesmo.

[000247] Composições farmacêuticas da invenção podem compreender ingredientes ativos adicionais bem como um anticorpo da invenção. Como acima mencionado, composições da invenção podem compreender um ou mais anticorpos da invenção. Também podem compreender agentes terapêuticos ou profiláticos adicionais. Por exemplo, onde uma composição farmacêutica da invenção é destinada ao uso no tratamento de uma desordem de sangramento, pode compreender adicionalmente um ou mais agentes destinados a reduzir os sintomas da desordem de sangramento. Por exemplo, a composição pode compreender um ou mais fatores coagulantes. A composição pode compreender um ou mais componentes destinados a melhorar a condição do paciente. Por exemplo, onde a composição é destinada para o uso no tratamento de pacientes que sofrem de hemorragia não desejada, tais como pacientes que sofrem cirurgia ou pacientes que sofrem de ferida, a composição pode compreender um ou mais analgésicos, anestésicos, agentes imunossupressores ou anti-inflamatórios. Também estão incluídos no escopo da presente

invenção conjuntos compreendendo anticorpos ou outras composições da invenção e instruções de uso. Tal conjunto pode conter ainda um ou mais reagentes adicionais, tais como um agente terapêutico ou profilático adicional como discutido acima.

[000248] Os anticorpos, outras moléculas e composições da presente invenção têm numerosas utilidades terapêuticas in vitro e in vivo que envolvem o tratamento e prevenção de desordens coagulantes relacionadas. Por exemplo, estes anticorpos e composições podem ser administrados a células em cultura, in vitro ou ex vivo, ou a indivíduos humanos, por exemplo, in vivo, para prevenir ou tratar uma variedade de desordens.

[000249] Em particular, a presente invenção fornece métodos para o tratamento de desordens de sangramento ou para o aumento da coagulação sanguínea compreendendo administração a um paciente que o requer de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou outra molécula ou composição da invenção. Por exemplo, tais métodos podem ser para o tratamento de deficiências de fator de coagulação, tais como hemofilia A, hemofilia B, deficiência de Fator XI, deficiência de Fator VII, trombocitopenia ou doença de von Willebrand. Tais métodos podem ser para o tratamento de condições acompanhadas pela presença de um inibidor de fator de coagulação. Tais métodos podem ser para o tratamento da hemorragia excessiva. Os anticorpos e composições da invenção podem ser usados para tratar pacientes antes, durante, ou após cirurgia ou terapia anticoagulante ou após trauma. Os anticorpos e composições descritas neste pedido podem ser usados em qualquer tal tratamento ou podem ser usados na produção de um medicamento para uso em qualquer tal tratamento.

[000250] Os anticorpos e as composições da presente invenção podem ser administrados para tratamentos profiláticos/preventivos e/ou terapêuticos.

[000251] Em aplicações terapêuticas, os anticorpos ou composições são administrados a um indivíduo já sofrendo de uma desordem ou condição como descrito acima, em uma quantidade suficiente para curar, aliviar ou parcialmente deter a condição ou um ou mais de seus sintomas. Tal tratamento terapêutico pode resultar em uma redução na severidade de sintomas de doença, ou aumento em frequência ou duração de períodos sem sintoma. Uma quantidade adequada para realizar isto é definida como "quantidade terapeuticamente eficaz". Por exemplo, onde o tratamento é para a hemorragia não desejada, a terapia pode ser definida como uma redução a quantidade de hemorragia ou coagulação adequada para parar a hemorragia completamente.

[000252] Em aplicações profiláticas ou preventivas, os anticorpos ou composições são administrados a um indivíduo em risco de uma desordem ou condição como descrito acima, em uma quantidade suficiente para prevenir ou reduzir os efeitos subsequentes da condição ou um ou mais dos seus sintomas. Uma quantidade adequada para realizar isto é definida como uma "quantidade profilaticamente eficaz". Por exemplo, onde o tratamento é para prevenir hemorragia não desejada, um efeito profilático pode ser definido como a prevenção de hemorragia ou um período reduzido ou quantidade de hemorragia em comparação com aquele que seria visto na ausência do modulador.

[000253] Quantidades eficazes para cada fim dependerão da severidade da doença ou injúria bem como o peso e estado geral do indivíduo.

[000254] Como usado neste pedido, o termo "indivíduo" inclui qualquer animal humano ou não humano. O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos,

cavalos, vacas, frangos, animais anfíbios, répteis, etc.

[000255] Um anticorpo ou uma composição da presente invenção pode ser administrado através de uma ou mais vias de administração que usam uma ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado pelo versado, a via e/ou modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Vias preferenciais de administração de anticorpos ou composições da invenção incluem vias parenterais intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoniais, subcutâneas, espinhais ou outras de administração, por exemplo, por injeção ou infusão. A frase "administração parenteral", como usada neste pedido, significa meios de administração além de administração entérica e tópica, normalmente por injeção. Alternativamente, um anticorpo ou composição da invenção podem ser administrados através de uma via não parenteral, tal como uma via tópica, epidérmica ou mucosal de administração.

[000256] Similarmente, um anticorpo da invenção pode ser usado para a produção de um medicamento adequado para administração parenteral.

[000257] Um anticorpo da invenção pode ser usado para a produção de um medicamento adequado para administração intravenosa.

[000258] Um anticorpo da invenção pode ser usado para a produção de um medicamento adequado para administração intramuscular.

[000259] Um anticorpo da invenção pode ser usado para a produção de um medicamento adequado para administração subcutânea.

[000260] Uma dosagem adequada de um anticorpo da invenção pode ser determinada por um profissional médico versado. Níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados para obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para alcançar a resposta terapêutica

desejada de um paciente particular, composição, e modo de administração, sem ser tóxica ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade do anticorpo empregado particular, a via de administração, o tempo de administração, a taxa da excreção do anticorpo, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições empregadas particulares, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica prévia do paciente sendo tratado, e como fatores bem conhecidos nas técnicas médicas.

[000261] Uma dose adequada de um anticorpo da invenção pode ser, por exemplo, na faixa de aproximadamente 0,1 μg/kg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal do paciente a ser tratado. Por exemplo, uma dosagem adequada pode ser de aproximadamente 1 μg/kg a aproximadamente 10mg/kg de peso corporal por dia ou de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por dia. Uma dose adequada de um anticorpo da invenção pode estar na faixa de 2 a 200 mg/kg, tais como aproximadamente 150 a 200 mg/kg, tais como aproximadamente 150 a 170 mg/kg, tais como aproximadamente 100 a 150 mg/kg, tais como aproximadamente 50 a 100 mg/kg, tais como aproximadamente 70 a 90 mg/kg, tais como aproximadamente 10 a 50 mg/kg, tais como aproximadamente 10 a 30 mg/kg.

[000262] Outras dosagens adequadas podem ser aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg, tais como aproximadamente 0,1 a 1 mg/kg, tais como aproximadamente 1 a 2 mg/kg ou aproximadamente 2 a 3 mg/kg ou aproximadamente 4 a 5 mg/kg ou aproximadamente 5 a 6 mg/kg ou aproximadamente 6 a 7 mg/kg ou aproximadamente 7 a 8 mg/kg ou aproximadamente 8 a 9 mg/kg ou aproximadamente 9 a 10 mg/kg; ou aproximadamente 10 a 21 mg/kg, tais como aproximadamente 10 a 11

mg/kg, ou aproximadamente 11 a 12 mg/kg, ou aproximadamente 12 a 13 mg/kg, ou aproximadamente 13 a 14 mg/kg, ou aproximadamente 14 a 15 mg/kg, ou aproximadamente 15 a 16 mg/kg, ou aproximadamente 16 a 17 mg/kg, ou aproximadamente 17 a 18 mg/kg, ou aproximadamente 18 a 19 mg/kg, ou aproximadamente 19 a 20 mg/kg ou aproximadamente 20 a 21 mg/kg.

[000263] A quantidade do anticorpo monoclonal administrado a um indivíduo pode ser tal que sua administração resulta em uma concentração plasmática individual de aproximadamente 10 μg/mL a aproximadamente 40 μg/mL, tal como aproximadamente 15 a 35 μg/mL, tal como aproximadamente 10 a 15 μg/mL, tal como aproximadamente 15 a 20 μg/mL, tal como aproximadamente 20 a 25 μg/mL, tal como aproximadamente 25 a 30 μg/mL, tal como aproximadamente 30 a 35 μg/mL, tal como aproximadamente 35 a 40 μg/mL, do dito anticorpo monoclonal. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolus único pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É em particular vantajoso formular composições parenterais na forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma de unidade de dosagem como usada neste pedido se refere a unidades fisicamente discretas ajustadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada do composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário.

[000264] Anticorpos podem ser administrados em uma dose única ou em múltiplas doses. Múltiplas doses podem ser administradas através

das mesmas ou diferentes vias e às mesmas ou diferentes posições. Alternativamente, os anticorpos podem ser administrados como uma formulação de liberação sustentada, caso em que a administração menos frequente é necessária. Dosagem e frequência podem variar dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente e a duração do tratamento que é desejado. Dosagem e frequência de administração também podem variar dependendo de se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa pode ser administrada em intervalos relativamente não frequentes ao longo de um período de tempo maior. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta pode ser administrada, por exemplo, até que o paciente mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença.

[000265] Dessa forma, um anticorpo da invenção pode ser administrado: aproximadamente diariamente, aproximadamente dia sim dia não, aproximadamente a cada terceiro dia, aproximadamente a cada quarto dia, aproximadamente a cada quinto dia, aproximadamente a cada sexto dia; aproximadamente a cada semana, tais como a cada 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 dias; aproximadamente semana sim, semana não, tais como a cada 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17 dias; aproximadamente a cada terceira semana, tal como a cada 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 dias; aproximadamente a cada quarta semana, tal como a cada 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31 dias. Um anticorpo da invenção também pode ser administrado sob demanda.

[000266] Como mencionado acima, anticorpos da invenção podem ser coadministrados com um ou mais agentes terapêuticos. O outro agente pode ser um agente que aumentará os efeitos do modulador. O outro agente pode ser um agente que atua para aumentar a coagulação sanguínea, tal como um fator de coagulação sanguínea. Em particular, os moduladores da invenção podem ser

coadministrados com o Fator VII(a) ou FVIII(a). O outro agente pode ser destinado a tratar outros sintomas ou condições do paciente. Por exemplo, o outro agente pode ser um analgésico, anestésico, agente imunossupressor ou anti-inflamatório.

[000267] Administração combinada de dois ou mais agentes pode ser alcançada de diversos modos diferentes. Em uma modalidade, o anticorpo e o outro agente podem ser administrados em conjunto em uma composição única. Em outra modalidade, o anticorpo e outro agente podem ser administrados em composições separadas como parte de uma terapia combinada. Por exemplo, o modulador pode ser administrado antes, após ou concorrentemente com o outro agente.

[000268] O termo "tratamento", como usado neste pedido, se refere à terapia médica de qualquer humano ou outro indivíduo animal em necessidade do mesmo. Espera-se que o dito indivíduo tenha passado por exame físico por um profissional médico ou um profissional médico veterinário, que deu um diagnóstico experimental ou definitivo que indicaria que o uso do dito tratamento específico é benéfico para a saúde do dito humano ou outro indivíduo animal. A regulação de tempo e o alvo do dito tratamento podem variar de um indivíduo a outro, de acordo com o status quo da saúde do indivíduo. Dessa forma, o dito tratamento pode ser profilático, paliativo, sintomático e/ou curativo. Quanto a presente invenção, os tratamentos profiláticos, paliativos, sintomáticos e/ou curativos podem representar aspectos separados da invenção.

[000269] Dessa forma, um anticorpo da invenção pode ser administrado parenteralmente.

[000270] Um anticorpo da invenção pode ser administrado intravenosamente.

[000271] Um anticorpo da invenção pode ser administrado intramuscularmente.

[000272] Um anticorpo da invenção pode ser administrado subcutaneamente.

[000273] Um anticorpo da invenção pode ser administrado profilaticamente,

[000274] Um anticorpo da invenção pode ser administrado terapeuticamente (sob demanda).

[000275] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de reduzir significativamente a perda sanguínea.

[000276] Um anticorpo da invenção pode ser capaz de reduzir significativamente o tempo de sangramento.

[000277] Dessa forma, a invenção é também um método de tratamento de um indivíduo em necessidade do mesmo com um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI, em que a quantidade do anticorpo monoclonal administrado é aquela de saturação de seu alvo. A quantidade do anticorpo monoclonal administrado pode ser aquela de saturação de TFPI solúvel. A quantidade do anticorpo monoclonal administrado pode ser aquela de saturação de TFPI ligado ao endotélio.

[000278] O termo "coagulopatia", como usado neste pedido, se refere a uma tendência hemorrágica aumentada que pode ser causada por qualquer deficiência qualitativa ou quantitativa de qualquer componente pró-coagulativo da cascata de coagulação normal, ou qualquer regulação para cima de fibrinólise. Tais coagulopatias podem ser congênitas e/ou adquiridas e/ou iatrogênicas e são identificadas por um versado na técnica.

[000279] Exemplos não limitantes de hipocoagulopatias congênitas são hemofilia A, hemofilia B, deficiência em Fator VII, deficiência em Fator XI, doença de von Willebrand e trombocitopenias, tais como trombastenia de Glanzmann e síndrome de Bernard-Soulier.

[000280] Um exemplo não limitante de uma coagulopatia adquirida é

a deficiência de serina protease causada pela deficiência de vitamina K; tal deficiência de vitamina K pode ser causada pela administração de um antagonista de vitamina K, tal como warfarina. Coagulopatia adquirida também pode ocorrer após trauma extenso. Neste caso de outra maneira conhecido como "ciclo vicioso de sangramento", é caracterizado pela hemodiluição (trombocitopenia dilucional e diluição de fatores coagulantes), hipotermia, consumo de fatores coagulantes e dessarranjos metabólicos (acidose). Terapia com fluidos e fibrinólise aumentada podem exacerbar esta situação. A dita hemorragia pode ser de qualquer parte do corpo.

[000281] Hemofilia A "com inibidores" (isto é, alo-anticorpos contra o fator VIII) e a hemofilia B "com inibidores" (isto é, alo-anticorpos contra o fator IX) são exemplos não limitantes de coagulopatias que são em parte congênitas e em parte adquiridas.

[000282] Um exemplo não limitante de uma coagulopatia iatrogênica é uma superdosagem de medicação anticoagulante - tal como heparina, aspirina, warfarina e outros inibidores de agregação de plaqueta - que pode ser prescrita para tratar doença tromboembólica. Um segundo exemplo, não limitante de coagulopatia iatrogênica é aquela que é induzida pela terapia com fluidos em excesso e/ou inapropriados, tal como aquela que pode ser induzida por uma transfusão de sangue.

[000283] Em uma modalidade da presente invenção, hemorragia está associada à hemofilia A ou B. Em outra modalidade, hemorragia está associada à hemofilia A ou B com inibidores adquiridos. Em outra modalidade, hemorragia está associada à trombocitopenia. Em outra modalidade, hemorragia está associada à doença de von Willebrand. Em outra modalidade, hemorragia está associada ao dano tecidual severo. Em outra modalidade, hemorragia está associada ao trauma severo. Em outra modalidade, hemorragia está associada à cirurgia.

Em outra modalidade, hemorragia está associada à gastrite hemorrágica e/ou enterite. Em outra modalidade, hemorragia é hemorragia uterina profusa, tal como na ruptura placentária. Em outra modalidade, hemorragia ocorre em órgãos com uma possibilidade limitada para hemostasia mecânica, tal como intracranialmente, intraauricularmente ou intraocularmente. Em outra moda-lidade, hemorragia está associada à terapia de anticoagulante.

[000284] Um anticorpo da presente invenção pode ser usado para tratar um indivíduo com uma coagulopatia. Dessa forma, a invenção é também o uso de um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI, para o tratamento de um indivíduo em necessidade do mesmo; bem como uso do dito anticorpo para a produção de um medicamento para o tratamento de um indivíduo em necessidade do mesmo. Além disso, a invenção é um método de tratamento de um indivíduo em necessidade do mesmo com um anticorpo monoclonal que é capaz de ligação ao domínio K2 de TFPI.

[000285] O uso do dito anticorpo monoclonal da invenção pode reduzir significativamente a perda sanguínea.

[000286] O uso do dito anticorpo monoclonal da invenção pode reduzir significativamente o tempo de sangramento.

[000287] Além disso, o uso do dito anticorpo monoclonal da invenção pode reduzir o tempo de coagulação *in vivo* sem causar trombocitopenia transiente.

MODALIDADES

[000288] A seguir, uma lista não limitante de modalidades da presente invenção:

[000289] Modalidade 1: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar especificamente ao domínio K2 de TFPI, em que o dito anticorpo é capaz de ligação a um epitopo compreendendo um ou mais resíduos selecionados a partir do grupo consistindo em E10, E11, D12, P13,

R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, F35, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2.

[000290] Modalidade 2: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 1, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo um epitopo compreendendo o resíduo E10 da SEQ ID NO: 2.

[000291] Modalidade 3: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo um epitopo compreendendo o resíduo E11 da SEQ ID NO: 2.

[000292] Modalidade 4: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo D12 da SEQ ID NO: 2.

[000293] Modalidade 5: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo P13 da SEQ ID NO: 2.

[000294] Modalidade 6: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo R17 da SEQ ID NO: 2.

[000295] Modalidade 7: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo Y19 da SEQ ID NO: 2.

[000296] Modalidade 8: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo T21 da SEQ ID NO: 2.

[000297] Modalidade 9: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo Y23 da SEQ ID NO: 2.

[000298] Modalidade 10: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo F24 da SEQ ID NO: 2.

[000299] Modalidade 11: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo N26 da SEQ ID NO: 2.

[000300] Modalidade 12: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo Q28 da SEQ ID NO: 2.

[000301] Modalidade 13: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo Q31 da SEQ ID NO: 2.

[000302] Modalidade 14: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo C32 da SEQ ID NO: 2.

[000303] Modalidade 15: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo E33 da SEQ ID NO: 2.

[000304] Modalidade 16: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é

capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo R34 da SEQ ID NO: 2.

[000305] Modalidade 17: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo F35 da SEQ ID NO: 2.

[000306] Modalidade 18: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo K36 da SEQ ID NO: 2.

[000307] Modalidade 19: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades acima, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo L50 da SEQ ID NO: 2.

[000308] Modalidade 20: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 16 e 18 a 19, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo os resíduos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2.

[000309] Modalidade 21: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 3,5 a 9, 12 a 13 e 15 a 19, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo os resíduos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 e L50 da SEQ ID NO: 2.

[000310] Modalidade 22: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI, em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende os resíduos de aminoácidos:

- E, na posição correspondente à posição 31,
- S, na posição correspondente à posição 32,
- D, na posição correspondente à posição 33,

- Y, na posição correspondente à posição 37,
- A, na posição correspondente à posição 96,
- T, na posição correspondente à posição 97 e
- F, na posição correspondente à posição 99

da SEQ ID NO: 15;

e em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende os resíduos de aminoácidos:

- N, na posição correspondente à posição 31,
- R, na posição correspondente à posição 53,
- S, na posição correspondente à posição 54,
- Y, na posição correspondente à posição 57,
- Y, na posição correspondente à posição 59,
- F, na posição correspondente à posição 60,
- P, na posição correspondente à posição 61,
- D, na posição correspondente à posição 62,
- Q, na posição correspondente à posição 65,
- Y, na posição correspondente à posição 102,
- D, na posição correspondente à posição 103 e
- D, na posição correspondente à posição 106

da SEQ ID NO: 18.

[000311] Modalidade 23: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende os resíduos de aminoácidos:

- E, na posição correspondente à posição 31,
- S, na posição correspondente à posição 32,
- D, na posição correspondente à posição 33,
- Y, na posição correspondente à posição 37,
- A, na posição correspondente à posição 96,
- T, na posição correspondente à posição 97 e
- F, na posição correspondente à posição 99

da SEQ ID NO: 15;

e em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende os resíduos de aminoácidos:

- N, na posição correspondente à posição 31,
- R, na posição correspondente à posição 53,
- S, na posição correspondente à posição 54,
- Y, na posição correspondente à posição 57,
- Y, na posição correspondente à posição 59,
- F, na posição correspondente à posição 60,
- P, na posição correspondente à posição 61,
- D, na posição correspondente à posição 62,
- Q, na posição correspondente à posição 65,
- Y, na posição correspondente à posição 102,
- D, na posição correspondente à posição 103 e
- D, na posição correspondente à posição 106

da SEQ ID NO: 18.

[000312] Modalidade 24: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 22 ou modalidade 23, em que a dita cadeia pesada compreende ainda um S na posição correspondente à posição 52 da SEQ ID NO: 18.

[000313] Modalidade 25: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 22 a 23, em que a dita cadeia leve compreende ainda um H na posição correspondente à posição 98 da SEQ ID NO: 15 e a dita cadeia pesada compreende ainda um S na posição correspondente à posição 56 da SEQ ID NO: 18.

[000314] Modalidade 26: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18, em que um destes aminoácidos pode ser substituído por um

aminoácido diferente.

[000315] Modalidade 27: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21 que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18, em que um destes aminoácidos pode ser substituído por um aminoácido diferente.

[000316] Modalidade 28: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000317] Modalidade 29: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21 que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000318] Modalidade 30: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000319] Modalidade 31: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21 que é capaz de se ligar ao

domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000320] Modalidade 32: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000321] Modalidade 33: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21 que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000322] Modalidade 34: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000323] Modalidade 35: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21 que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um

aminoácido diferente.

[000324] Modalidade 36: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000325] Modalidade 37: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21 que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende uma sequência da CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000326] Modalidade 38: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18, em que um destes aminoácidos pode ser substituído por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000327] Modalidade 39: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, em que a cadeia pesada do

dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18, em que um destes aminoácidos pode ser substituído por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000328] Modalidade 40: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000329] Modalidade 41: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três

destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou

- uma sequência da CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000330] Modalidade 42: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18, em que um destes aminoácidos pode ser substituído por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente;

e em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou
- uma sequência da CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou

•uma sequência da CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000331] Modalidade 43: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende:

•uma sequência da CDR1 de aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18, em que um destes aminoácidos pode ser substituído por um aminoácido diferente; e/ou

•uma sequência da CDR2 de aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou

•uma sequência da CDR3 de aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente;

e em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende:

•uma sequência da CDR1 de aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou

•uma sequência da CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e/ou

•uma sequência da CDR3 de aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

[000332] Modalidade 44: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 26 a 43, em que as ditas substituições

de aminoácidos não compreendem os aminoácidos:

- N, na posição correspondente à posição 31

da região da CDR1 DE SEQ ID NO: 18;

- R, na posição correspondente à posição 53;
- S, na posição correspondente à posição 54;
- S, na posição correspondente à posição 56;
- Y, na posição correspondente à posição 57;
- Y, na posição correspondente à posição 59;
- F, na posição correspondente à posição 60;
- P, na posição correspondente à posição 61;
- D, na posição correspondente à posição 62; e
- Q, na posição correspondente à posição 65;

da região da CDR2 da SEQ ID NO: 18.

- Y, na posição correspondente à posição 102;
- D, na posição correspondente à posição 103; e
- D, na posição correspondente à posição 106;

da região da CDR3 da SEQ ID NO: 18.

- E, na posição correspondente à posição 31;
- S, na posição correspondente à posição 32;
- D, na posição correspondente à posição 33; e
- Y, na posição correspondente à posição 37;

da região da CDR1 da SEQ ID NO: 15.

- A, na posição correspondente à posição 96;
- T, na posição correspondente à posição 97;
- H, na posição correspondente à posição 98; e
- F, na posição correspondente à posição 99;

da região da CDR3 da SEQ ID NO: 15.

[000333] Modalidade 45: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 26 a 44, em que a dita substituição de aminoácido é uma substituição conservativa.

[000334] Modalidade 46: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 26 a 45, em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 que compreende aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18; e
- uma sequência da CDR2 que compreende aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18; e
- uma sequência da CDR3 que compreende aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18.

[000335] Modalidade 47: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 26 a 46, em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende:

- uma sequência da CDR1 que compreende aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15; e
- uma sequência da CDR2 que compreende aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15; e
- uma sequência da CDR3 que compreende aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15.

[000336] Modalidade 48: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 46 a 47, em que a cadeia pesada compreende:

- uma sequência da CDR1 que compreende aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18; e
- uma sequência da CDR2 que compreende aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18; e
- uma sequência da CDR3 que compreende aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18;

e em que a cadeia leve compreende:

- uma sequência da CDR1 que compreende aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15; e

- uma sequência da CDR2 que compreende aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15; e
- uma sequência da CDR3 que compreende aminoácidos 94 a 102 (LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15.

[000337] Modalidade 49: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende a SEQ ID NO: 15.

[000338] Modalidade 50: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende a SEQ ID NO: 18.

[000339] Modalidade 51: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que o dito anticorpo compreende as SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 18.

[000340] Modalidade 52: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que o dito anticorpo compreende a cadeia leve da SEQ ID NO: 21

[000341] Modalidade 53: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que o dito anticorpo compreende a cadeia pesada da SEQ ID NO: 24.

[000342] Modalidade 54: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 52 a 53, em que o dito anticorpo compreende a SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 24.

[000343] Modalidade 55: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, que é um anticorpo humanizado.

[000344] Modalidade 56: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 55, no qual a região de estrutura 2 da cadeia pesada compreende os aminoácidos:

- T, na posição correspondente à posição 40,
- E, na posição correspondente à posição 42,

- R, na posição correspondente à posição 44 e
- A, na posição correspondente à posição 49

da SEQ ID NO: 18.

[000345] Modalidade 57: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 55, no qual a região de estrutura 2 da cadeia pesada compreende os aminoácidos correspondentes às posições 36 a 49 (WVRQTPEKRLEWVA) da SEQ ID NO: 18.

[000346] Modalidade 58: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 54, que é um anticorpo humano.

[000347] Modalidade 59: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 54, que é um anticorpo quimérico.

[000348] Modalidade 60: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que o isotipo do dito anticorpo é IgG.

[000349] Modalidade 61: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 60, em que o dito isotipo é IgG1, IgG2 ou IgG4.

[000350] Modalidade 62: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 61, em que o isotipo do dito anticorpo é IgG4.

[000351] Modalidade 63: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 60 a 62, em que pelo menos um aminoácido da região Fc do dito anticorpo foi substituído por outro aminoácido.

[000352] Modalidade 64: O anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes em que a região Fc do dito anticorpo é pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 95%, tal como 95 a 100% idêntico aos aminoácidos 122-448 da SEQ ID NO: 24.

[000353] Modalidade 65: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb0281.

[000354] Modalidade 66: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 64, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb0281.

[000355] Modalidade 67: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb4904.

[000356] Modalidade 68: Um anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 66, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb4904.

[000357] Modalidade 69: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb2974.

[000358] Modalidade 70: Um anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 68, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb2974.

[000359] Modalidade 71: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb29741.

[000360] Modalidade 72: Um anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 70, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI com uma afinidade mais alta do que mAb29741.

[000361] Modalidade 73: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI, em que o KD do dito anticorpo é menor que 0,8 nM, tal como menor que 0,7 nM, tal como menor que 0,6 nM, tal como menor que 0,5 nM, tal como menor que 0,4 nM, tal como menor que 0,3 nM, tal como menor que 0,2 nM, tal como menor que 0,1 nM, tal como menor que 0,05 nM, tal como menor que 0,025 nM.

[000362] Modalidade 74: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 73, em que o K_D do dito anticorpo

é menor que 0,8 nM, tal como menor que 0,7 nM, tal como menor que 0,6 nM, tal como menor que 0,5 nM, tal como menor que 0,4 nM, tal como menor que 0,3 nM, tal como menor que 0,2 nM, tal como menor que 0,1 nM, tal como menor que 0,05 nM, tal como menor que 0,025 nM.

[000363] Modalidade 75: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades acima que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI associado à plaqueta.

[000364] Modalidade 76: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades acima que é capaz de inibição de TFPI solúvel.

[000365] Modalidade 77: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 76, em que o dito TFPI solúvel pode ser completamente inibido.

[000366] Modalidade 78: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades acima que é capaz de inibição de TFPI ligado à lipoproteína.

[000367] Modalidade 79: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades acima que é capaz de inibição de TFPI ligado à célula endotelial.

[000368] Modalidade 80: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI tal que FXa conserve sua atividade em pelo menos 91%, tal como pelo menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 99 a 100%, como medido em um ensaio de inibição de FXa.

[000369] Modalidade 81: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 79, que é capaz de se ligar a TFPI tal que FXa conserve sua atividade em pelo menos 91%, tal como pelo

menos 92%, tal como pelo menos 93%, tal como pelo menos 94%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98%, tal como pelo menos 99%, tal como 99 a 100% como medido em um ensaio de inibição de FXa.

[000370] Modalidade 82: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI tal que a porcentagem de TFPI livre em um indivíduo seja reduzida a menos de 30%, tal como menos de 29%, tal como menos de 28%, tal como menos de 27%, tal como menos de 26%, tal como menos de 25%, tal como menos de 24%, tal como menos de 23%, tal como menos de 22%, tal como menos de 21%, tal como menos de 20%, tal como menos de 19%, tal como menos de 18%, tal como menos de 17%, tal como menos de 16%, tal como menos de 15%, tal como menos de 14%, tal como menos de 13%, tal como menos de 12%, tal como menos de 11%, tal como menos de 10%, tal como menos de 9%, tal como menos de 8%, tal como menos de 7%, tal como menos de 6%, tal como menos de 5%, tal como menos de 4%, tal como menos de 3%, tal como menos de 2%, tal como menos de 1%, tal como entre 1% e 0%.

[000371] Modalidade 83: Um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 81, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI tal que a porcentagem de TFPI livre em um indivíduo seja reduzida a menos de 30%, tal como menos de 29%, tal como menos de 28%, tal como menos de 27%, tal como menos de 26%, tal como menos de 25%, tal como menos de 24%, tal como menos de 23%, tal como menos de 22%, tal como menos de 21%, tal como menos de 20%, tal como menos de 19%, tal como menos de 18%, tal como menos de 17%, tal como menos de 16%, tal como menos de 15%, tal como menos de 14%, tal como menos de 13%, tal como menos de 12%, tal como menos de 11%, tal como menos de 10%, tal como menos de 9%, tal como menos de 8%, tal como menos

de 7%, tal como menos de 6%, tal como menos de 5%, tal como menos de 4%, tal como menos de 3%, tal como menos de 2%, tal como menos de 1%, tal como entre 1% e 0%.

[000372] Modalidade 84: O anticorpo monoclonal de acordo com a modalidade 83, em que a quantidade de TFPI livre em um indivíduo é reduzida à dita porcentagem durante os 28 primeiros dias, tal como durante os 27 primeiros dias, tal como durante os 26 primeiros dias, tal como durante os 25 primeiros dias, tal como durante os 24 primeiros dias, tal como durante os 23 primeiros dias, tal como durante os 22 primeiros dias, tal como durante os 21 primeiros dias, tal como durante os 20 primeiros dias, tal como durante os 19 primeiros dias, tal como durante os 18 primeiros dias, tal como durante os 17 primeiros dias, tal como durante os 16 primeiros dias, tal como durante os 15 primeiros dias, tal como durante os 14 primeiros dias, tal como durante os 13 primeiros dias, tal como durante os 12 primeiros dias, tal como durante os 11 primeiros dias, tal como durante os 10 primeiros dias, tal como durante os 9 primeiros dias, tal como durante os 8 primeiros dias, tal como durante os 7 primeiros dias, tal como durante os 6 primeiros dias, tal como durante os 5 primeiros dias, tal como durante os 4 primeiros dias, tal como durante os 3 primeiros dias, tal como durante os 2 primeiros dias, tal como durante o primeiro dia após administração do dito anticorpo monoclonal a dito indivíduo.

[000373] Modalidade 85: Um anticorpo monoclonal, que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI e é capaz de neutralizar a inibição de TFPI de FVIIa/TF/FXa ligado à membrana em pelo menos 55%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 65%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 95%, tal como até 100%, tal como 100%, como medido em um ensaio de inibidor FVIIa/TF/FXa, quando TFPI é saturado com o dito

anticorpo.

[000374] Modalidade 86: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 84, em que o dito anticorpo é capaz de neutralização da inibição de TFPI de FVIIa/TF/FXa ligado à membrana em pelo menos 55%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 65%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 95%, tal como até 100%, tal como 100%, como medido em um ensaio de inibidor FVIIa/TF/FXa, quando TFPI é saturado com o dito anticorpo.

[000375] Modalidade 87: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI e que reduz o tempo de coagulação in vivo sem reduzir significativamente a contagem de plaquetas.

[000376] Modalidade 88: O anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 86, em que o dito anticorpo reduz o tempo de coagulação in vivo sem reduzir significativamente a contagem de plaquetas.

[000377] Modalidade 89: O anticorpo monoclonal, de acordo com as modalidades 88, em que a contagem das ditas plaquetas não diminui a aproximadamente 80%, tal como aproximadamente 75%, tal como aproximadamente 70%, tal como aproximadamente 65%, tal como aproximadamente 60%, tal como aproximadamente 55%, tal como aproximadamente 50%, tal como aproximadamente 45%, tal como aproximadamente 40%, tal como aproximadamente 35%, tal como aproximadamente 30%, tal como aproximadamente 25% da contagem de plaquetas original.

[000378] Modalidade 90: Um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar ao domínio K2 de TFPI e que reduz o tempo de coagulação in vivo sem causar trombocitopenia transiente.

[000379] Modalidade 91: O anticorpo monoclonal, de acordo com

qualquer uma das modalidades 1 a 89, em que o dito anticorpo reduz o tempo de coagulação *in vivo* sem causar trombocitopenia transiente.

[000380] Modalidade 92: Um fragmento do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes.

[000381] Modalidade 93: O fragmento de acordo com a modalidade 92, que é um fragmento Fab, um fragmento F(ab')2, um fragmento Fab', um fragmento Fd, um fragmento Fv ou um fragmento dAb.

[000382] Modalidade 94: Uma variante do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades, que é uma variante de deleção ou uma variante de inserção.

[000383] Modalidade 95: Uma formulação farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94.

[000384] Modalidade 96: Uma formulação farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94, em que a dita formulação é adequada para uso parenteral.

[000385] Modalidade 97: Uma formulação farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94, em que o dito anticorpo é adequado para uso intravenoso.

[000386] Modalidade 98: Uma formulação farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94, em que o dito anticorpo é adequado para uso intramuscular.

[000387] Modalidade 99: Uma formulação farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94, em que o dito anticorpo é adequado para uso subcutâneo.

[000388] Modalidade 100: Uso do anticorpo monoclonal de acordo

com qualquer uma das modalidades 1 a 94 para a produção de um medicamento adequado para administração parenteral.

[000389] Modalidade 101: Uso do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94 para a produção de um medicamento adequado para administração intravenosa.

[000390] Modalidade 102: Uso do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94 para a produção de um medicamento adequado para administração intramuscular.

[000391] Modalidade 103: Uso do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94 para a produção de um medicamento adequado para administração subcutânea.

[000392] Modalidade 104: Uso de um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94, para o tratamento de um indivíduo com uma coagulopatia.

[000393] Modalidade 105: Uso de acordo com a modalidade 104, em que o dito indivíduo tem qualquer coagulopatia congênita, adquirida e/ou iatrogênica, tal que possa ser selecionada a partir do grupo consistindo da hemofilia A, com ou sem inibidores, e hemofilia B, com ou sem inibidores.

[000394] Modalidade 106: Uso de acordo com qualquer uma das modalidades 95 a 105, em que o dito anticorpo monoclonal reduz significativamente a perda sanguínea.

[000395] Modalidade 107: Uso de acordo com qualquer uma das modalidades 95 a 106, em que o dito anticorpo monoclonal reduz significativamente o tempo de sangramento.

[000396] Modalidade 108: Uso de acordo com qualquer uma das modalidades 95 a 107, em que a quantidade do anticorpo monoclonal administrado resulta em uma concentração plasmática de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 40 µg/mL, tal como aproximadamente 15 a 35 µg/mL, tal como aproximadamente 10 a 15

µg/mL, tal como aproximadamente 15 a 20 µg/mL, tal como aproximadamente 20 a 25 µg/mL, tal como aproximadamente 25 a 30 µg/mL, tal como aproximadamente 30 a 35 µg/mL, tal como aproximadamente 35 a 40 µg/mL, do dito anticorpo monoclonal.

[000397] Modalidade 109: Um método de tratamento de um indivíduo com uma coagulopatia, compreendendo administração ao dito indivíduo do anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94.

[000398] Modalidade 110: O método de acordo com a modalidade 109, em que a dita coagulopatia é qualquer coagulopatia congênita, adquirida e/ou iatrogênica, tal que possa ser selecionada a partir do grupo consistindo da hemofilia A, com ou sem inibidores, e hemofilia B, com ou sem inibidores.

[000399] Modalidade 111: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 110, em que o dito anticorpo monoclonal é capaz de reduzir significativamente a perda sanguínea.

[000400] Modalidade 112: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 111, em que o dito anticorpo monoclonal é capaz de reduzir significativamente o tempo de sangramento.

[000401] Modalidade 113: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 112, em que a quantidade do anticorpo monoclonal administrada é aquela de saturação de seu alvo.

[000402] Modalidade 114: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 113, em que a quantidade do anticorpo monoclonal administrado é aquela de saturação de TFPI solúvel.

[000403] Modalidade 115: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 114, em que o dito anticorpo administrado é capaz de inibir completamente TFPI solúvel.

[000404] Modalidade 116: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 115, em que o dito anticorpo monoclonal é

administrado em uma quantidade suficiente para saturar TFPI ligado ao endotélio.

[000405] Modalidade 117: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 116, em que a quantidade do anticorpo monoclonal administrado resulta em uma concentração plasmática de aproximadamente 10 µg/mL a aproximadamente 40 µg/mL, tal como aproximadamente 15 a 35 µg/mL, tal como aproximadamente 10 a 15 µg/mL, tal como aproximadamente 15 a 20 µg/mL, tal como aproximadamente 20 a 25 µg/mL, tal como aproximadamente 25 a 30 µg/mL, tal como aproximadamente 30 a 35 µg/mL, tal como aproximadamente 35 a 40 µg/mL, do dito anticorpo monoclonal.

[000406] Modalidade 118: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 117, em que uma dose única pode ser administrada.

[000407] Modalidade 119: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 118, em que múltiplas doses podem ser administradas.

[000408] Modalidade 120: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 119, em que o dito anticorpo pode ser administrado diariamente.

[000409] Modalidade 121: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 120, em que o dito anticorpo pode ser administrado dia sim dia não.

[000410] Modalidade 122: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 121, em que o dito anticorpo pode ser administrado a cada terceiro dia.

[000411] Modalidade 123: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 122, em que o dito anticorpo pode ser administrado a cada quarto dia.

[000412] Modalidade 124: O método de acordo com qualquer uma

das modalidades 109 a 123, em que o dito anticorpo pode ser administrado a cada quinto dia.

[000413] Modalidade 125: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 124, em que o dito anticorpo pode ser administrado a cada sexto dia.

[000414] Modalidade 126: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 125, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado aproximadamente a cada semana, tal como a cada 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 dias.

[000415] Modalidade 127: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 126, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado aproximadamente semana sim, semana não, tal como a cada 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17 dias.

[000416] Modalidade 128: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 127, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado aproximadamente a cada terceira semana, tal como a cada 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 dias.

[000417] Modalidade 129: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 128, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado aproximadamente a cada quarta semana, tal como a cada 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 31 dias.

[000418] Modalidade 130: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 129, em que a dosagem pode ser aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1 a 1 mg/kg, tal como aproximadamente 1 a 2 mg/kg ou aproximadamente 2 a 3 mg/kg ou aproximadamente 4 a 5 mg/kg ou aproximadamente 5 a 6 mg/kg ou aproximadamente 6 a 7 mg/kg ou aproximadamente 7 a 8 mg/kg ou aproximadamente 8 a 9 mg/kg ou aproximadamente 9 a 10 mg/kg; ou aproximadamente 10 a 21 mg/kg, tal como aproximadamente 10 a 11 mg/kg, ou aproximadamente 11 a 12 mg/kg,

ou aproximadamente 12 a 13 mg/kg, ou aproximadamente 13 a 14 mg/kg, ou aproximadamente 14 a 15 mg/kg, ou aproximadamente 15 a 16 mg/kg, ou aproximadamente 16 a 17 mg/kg, ou aproximadamente 17 a 18 mg/kg, ou aproximadamente 18 a 19 mg/kg, ou aproximadamente 19 a 20 mg/kg ou aproximadamente 20 a 21 mg/kg.

[000419] Modalidade 131: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 130, em que a dosagem pode ser aproximadamente 2 a 200 mg/kg, tal como aproximadamente 150 a 200 mg/kg, tal como aproximadamente 150 a 170 mg/kg, tal como aproximadamente 100 a 150 mg/kg, tal como aproximadamente 50 a 100 mg/kg, tal como aproximadamente 70 a 90 mg/kg, tal como aproximadamente 10 a 50 mg/kg, tal como aproximadamente 10 a 30 mg/kg.

[000420] Modalidade 132: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 131, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado parenteralmente.

[000421] Modalidade 133: O método de acordo com a modalidade 132, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado intravenosamente.

[000422] Modalidade 134: O método de acordo com a modalidade 133, em que a dosagem do dito anticorpo monoclonal pode ser aproximadamente 10 a 20 mg/kg.

[000423] Modalidade 135: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 133 a 134, em que o anticorpo monoclonal pode ser administrado semana sim, semana não.

[000424] Modalidade 136: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 133 a 135, em que o anticorpo monoclonal pode ser administrado a cada terceira semana.

[000425] Modalidade 137: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 133 a 136, em que o anticorpo monoclonal pode ser

administrado a cada quarta semana.

[000426] Modalidade 138: O método de acordo com a modalidade 133, em que a dosagem do dito anticorpo monoclonal pode ser aproximadamente 10 a 20 mg/kg e o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado semana sim, semana não.

[000427] Modalidade 139: O método de acordo com a modalidade 133, em que a dosagem do dito anticorpo monoclonal pode ser aproximadamente 10 a 20 mg/kg e o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado a cada terceira semana.

[000428] Modalidade 140: O método de acordo com a modalidade 133, em que a dosagem do dito anticorpo monoclonal pode ser aproximadamente 10 a 20 mg/kg e o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado a cada quarta semana.

[000429] Modalidade 141: O método de acordo com a modalidade 132, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado intramuscularmente.

[000430] Modalidade 142: O método de acordo com a modalidade 132, em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado subcutaneamente.

[000431] Modalidade 143: O método de acordo com a modalidade 132, em que a dosagem do dito anticorpo monoclonal pode ser aproximadamente 1 mg/kg

[000432] Modalidade 144: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 141 a 143, em que o anticorpo monoclonal pode ser administrado diariamente.

[000433] Modalidade 145: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 141 a 144, em que o anticorpo monoclonal pode ser administrado dia sim dia não.

[000434] Modalidade 146: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 141 a 145, em que a dosagem do dito anticorpo

monoclonal pode ser aproximadamente 1 mg/kg e em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado diariamente.

[000435] Modalidade 147: O método de acordo com a modalidade de qualquer uma das modalidades 141 a 146, em que a dosagem do dito anticorpo monoclonal pode ser aproximadamente 1 mg/kg e em que o dito anticorpo monoclonal pode ser administrado dia sim dia não.

[000436] Modalidade 148: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 147, em que o dito anticorpo pode ser administrado profilaticamente.

[000437] Modalidade 149: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 148, em que o dito anticorpo pode ser administrado terapeuticamente (sob demanda).

[000438] Modalidade 150: O método de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 149, em que o dito anticorpo administrado é capaz de inibir completamente (100%) TFPI solúvel.

[000439] Modalidade 151: Um polinucleotídeo que codifica o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94.

[000440] Modalidade 152: Um polinucleotídeo de acordo com a modalidade 151, que compreende pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo das SEQ ID NOs: 13, 16, 19 e 22.

[000441] Modalidade 153: Um polinucleotídeo de acordo com a modalidade 152, que compreende a SEQ ID NO: 19.

[000442] Modalidade 154: Um polinucleotídeo de acordo com a modalidade 152, que compreende a SEQ ID NO. 22.

[000443] Modalidade 155: Um polinucleotídeo de acordo com a modalidade 152, que compreende as SEQ ID NOs: 19 e 22.

[000444] Modalidade 156: Uma célula eucariótica que compreende o polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 151 a

155.

[000445] Modalidade 157: Uma célula eucariótica que expressa o anticorpo monoclonal, ou fragmento do mesmo, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 94.

[000446] Modalidade 158: A célula eucariótica de acordo com a modalidade 157, que é uma célula mamífera.

[000447] Modalidade 159: A célula eucariótica de acordo com a modalidade 157, que é uma célula de levedura.

[000448] Modalidade 160: A célula mamífera de acordo com a modalidade 158, que é selecionada a partir do grupo consistindo em HEK293, CHO, BHK, NSO e células de retina humana.

EXEMPLOS

[000449] A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitação adicional. Os conteúdos de todas as Figuras e todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicadas citados em todas as partes deste pedido de patente são expressamente incorporados neste pedido por referência.

Exemplo 1: Produção e caracterização de anticorpos monoclonais direcionados contra TFPI

[000450] Anticorpos monoclonais foram gerados contra o inibidor da via de fator tecidual (TFPI). Um anticorpo monoclonal tendo a especificidade de ligação desejada foi identificado, clonado e sequenciado. Foi encontrado que este anticorpo reduzia significativamente o tempo de sangramento de cutícula *in vivo* e não levava a nenhuma diminuição significante no número de plaquetas.

Métodos e Resultados

[000451] Todos os conjuntos foram usados de acordo com instruções dos fabricantes. Abreviaturas: HC: cadeia pesada; LC: cadeia leve; VH: domínio variável - cadeia pesada; VL: domínio

variável - cadeia leve; PCR: reação de polimerase em cadeia.

Imunização e fusão

[000452] Os camundongos foram imunizados tanto com TFPI completo como com a versão TFPIB161B curta que contém somente os dois primeiros domínios Kunitz. Camundongos RBF foram usados para imunização e produção de anticorpos monoclonais de camundongo. Injeções foram feitas subcutaneamente nas costas dos camundongos. 20µg de proteína foram misturadas com o adjuvante de Freund completo da primeira injeção. Na imunização subsequente, adjuvante de Freund incompleto foi usado com a mesma concentração do antígeno. Dez dias após a última imunização, sangue ocular de camundongos foi rastreado por ELISA para anticorpos específicos de TFPI. Camundongos com títulos séricos positivos foram estimulados com 10 µg de TFPI por injeção intravenosa, e sacrificados após três dias. Os baços foram removidos assepticamente e dispersados em uma suspensão celular única. Fusão de células de baço e células de mieloma foi feita pelo método PEG ou por eletrofusão.

Ensaio de ligação: ELISA

[000453] Imunoplacas foram recobertas com IgG anti-camundongo. Sobrenadantes de cultura das células de hibridoma foram adicionados às placas e, após lavagem, TFPI humano biotinilado solúvel ou TFPIB161B foi adicionado para testar para ligação específica.

Ensaios de neutralização: ensaio de FXa e ensaio de TF/FVIIa/FXa

[000454] Ensaio de inibição de FXa: uma concentração fixa de TFPI dando origem à inibição de 90% de FXa foi pré-incubada com sobrenadantes de cultura de células de hibridoma contendo anticorpos monoclonais anti-TFPI e adicionados a FXa mais substrato cromogênico específico para FXa. Este ensaio direciona a ligação de TFPI a FXa (descrito em maiores detalhes no exemplo 6).

[000455] Ensaio de inibição de FVIIa/TF/FXa: 1) Incubação de sobrenadantes de cultura de células de hibridoma contendo anticorpos monoclonais anti-TFPI e fixados em TFPI (inibição de 90% de FVIIa/TF); 2) Incubação de TFPI + FVIIa + TF + FXa; 3) Adição de FX (FX>>FXa) seguido por incubação com substrato cromogênico FXa (descrito em maiores detalhes no exemplo 7).

Tempo de protrombina diluída (dPT)

[000456] Uma análise de Protrombina diluída (PT): plasma humano em combinação com tromboplastina humana diluída (fonte de TF). O tempo de coágulo no plasma foi medido na adição de aumento de concentrações de anticorpo monoclonal TFPI purificado em proteína A para procurar a redução dose-dependente do tempo de coagulação. FVIIa (25 nM) foi o controle positivo e deve encurtar este tempo de coágulo.

Análise de interação de ligação

[000457] Análise de interação de ligação foi obtida por Ressonância de plásmons de superfície em um Biacore 3000. Captura do anticorpo monoclonal relevante em uma concentração fixa foi obtida com anti-IgG de camundongo imobilizada. Concentrações diferentes de TFPI foram testadas. Determinação de constantes de ligação (k_{on}, k_{off}, K_D) foi obtida assumindo uma interação 1:1 de TFPI e o anticorpo de interesse (descrito em maiores detalhes no exemplo 8).

Tromboelastografia

[000458] Esta registra a cinética de formação de coágulo e fibrinólise no sangue total. Condição similar à Hemofilia A é induzida pela pré-incubação do sangue com IgG anti-FVIII de neutralização.

Clonagem e sequenciamento de anticorpo

[000459] Sequências da cadeia pesada e cadeia leve murina de um anticorpo anti-TFPI foram clonadas de um hibridoma: TFPI-4F36A1B2 (abreviado neste pedido para 4F36). RNA total, extraído de células de

hibridoma usando o Conjunto RNeasy-Mini de Qiagen, foi usado como moldes para síntese de cDNA. cDNA foi sintetizado em uma reação 5'-RACE usando o conjunto de amplificação SMART™ RACE cDNA de Clontech. Amplificação do alvo subsequente de sequências HC e LC foi realizada por PCR usando Phusion Hot Star polimerase (Finnzymes) e a mistura de iniciador universal (UPM) incluída no conjunto SMART™ RACE como um iniciador de sentido direto. Um iniciador de sentido reverso com a seguinte sequência foi usado para amplificação de HC (domínio de VH): 5'-CCCTTGACCAGGCATCCCAG-3' (iniciador No.129). Um iniciador de sentido reverso com a seguinte sequência foi usado para a amplificação de LC: 5'-GCTCTAGACTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTG-3' (iniciador No.69).

[000460] Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel, extraídos usando GFX PCR DNA e Conjunto de Purificação de Banda de Gel de GE Healthcare Bio-Sciences e clonados para o sequenciamento usando Conjunto de Clonagem Zero Blunt TOPO PCR e E.coli quimicamente competente TOP10 de Invitrogen. A colônia de PCR foi realizada em colônias selecionadas usando uma AmpliTaq Gold Master Mix de Applied Biosystems e iniciadores M13uni/M13rev. A limpeza de colônia PCR foi realizada usando mistura de enzima EXOSAP-IT (usb). Sequenciamento foi realizado em MWG Biotech, Martinsried, Alemanha usando M13uni(-21)/M13rev (-29) ou iniciadores de sequenciamento T3/T7. Sequências foram analisadas e anotadas usando o programa VectorNTI.

[000461] Do hibridoma TFPI-4F36A1B2, um murino capa único simples tipo LC foi identificado e um HC murino único simples, subclasse IgG1. Sequência LC é dada na SEQ ID NO: 6 e sequência HC é dada na SEQ ID NO: 10. Sequências VH & VL são mostradas na

Figura 2, sequências do peptídeo líder não estão incluídas.

Epitopos

[000462] TFPI1 inclui três domínios Kunitz (ver Figura 4). Resíduos acessíveis superficiais dos domínios Kunitz de TFPI1 foram identificados de estruturas existentes de TFPI1-2. Em particular, considera-se que resíduos com uma aceitabilidade relativa maior que 40% são acessíveis superficialmente. Para TFPI1-2, isto compreende (ver Figura 5): aminoácidos 94 a 95, 98, 100 a 110, 118 a 121, 123 a 124, 131, 134, 138 a 142 e 144 a 145.

Exemplo 2: Clonagem e sequenciamento de mAb TFPI4F36A1B2 de camundongo

[000463] Este exemplo descreve clonagem e sequenciamento da cadeia pesada murina e sequências da cadeia leve do anticorpo anti-TFPI: TFPI4F36A1B2.

[000464] RNA total foi extraído de células de hibridoma usando o Conjunto RNeasy-Mini de Qiagen e usado como molde para síntese de cDNA. cDNA foi sintetizado em uma reação 5'-RACE usando conjunto de amplificação SMART™ RACE cDNA de Clontech. Amplificação alvo subsequente de sequências HC e LC foi realizada por PCR usando Phusion Hot Start polimerase (Finnzymes) e a mistura de iniciador universal (UPM) incluída no conjunto SMART™ RACE como iniciador de sentido direto. O iniciador de sentido reverso identificado como SEQ ID NO: 11 foi usado para amplificação de HC (domínio VH) e o iniciador de sentido reverso identificado como SEQ ID NO: 12 foi usado para amplificação de LC. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel, extraídos usando GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit de GE Healthcare Bio-Sciences e clonados para o sequenciamento usando Conjunto de Clonagem Zero Blunt TOPO PCR e *E.coli* quimicamente competente TOP10 (Invitrogen). A colônia de PCR foi realizada em colônias selecionadas

usando uma AmpliTaq Gold Master Mix de Applied Biosystems e iniciadores de M13uni/M13rev. A limpeza de colônia de PCR foi realizada usando a mistura de enzima EXOSAP-IT (USB). Sequenciamento foi realizado em MWG Biotech, Martinsried, Alemanha usando M13uni(-21)/M13rev(-29) ou iniciadores de sequenciamento T3/T7. Sequências foram analisadas e anotadas usando o programa VectorNTI. Todos os conjuntos e reagentes foram usados de acordo com as instruções do fabricante.

[000465] Um murino capa único simples tipo LC e um HC murino único simples, subclasse IgG1 foi identificado. As sequências de ácido nucleico e aminoácidos da cadeia leve variável são mostradas nas SEQ ID NOs: 3 e 5, respectivamente. As sequências de ácido nucleico e aminoácidos da cadeia pesada variável são mostradas nas SEQ ID NOs: 7 e 9, respectivamente. As sequências do peptídeo líder não estão incluídas nestas sequências.

Pesquisas de BLAST

[000466] As sequências de aminoácidos VL e VH anti-TFPI4F36A1B2 traduzidas foram usadas como sequências de questão. Pesquisas de BLAST foram realizadas contra sequências no banco de dados Uniprot usando o programa de traduções BLASTp. A saída de VH anti-TFPI4F36A1B2 produz alinhamentos dos quais >20 dos 50 escores de identidade mais altos foram sequências da cadeia pesada de Ig murina. Os escores de identidade mais altos foram 81% (99/121) contra uma cadeia pesada de Ig de camundongo. A saída de VL anti-TFPI4F36A1B2 produz alinhamentos dos quais >30 do 50 escores de identidade mais altos foram sequências da cadeia leve de Ig capa murina. O escore de identidade mais alta foi 92% (105/113) contra uma cadeia leve de Ig capa de camundongo. Finalmente, as sequências VH e VL anti-TFPI4F36A1B2 representam novas sequências únicas.

Geração de vetores de expressão anti-TFPI4F36A1B2 de camundongo

[000467] Uma série de vetores de expressão baseados no promotor CMV (vetores pTT) foi gerada para a expressão transiente do anticorpo TFPI4F36 de camundongo no sistema de expressão baseado em HEK293-6E EBNA desenvolvido por Yves Durocher (Durocher *et al.* Nucleic Acid Research, 2002). Além do promotor CMV, os vetores contêm uma origem pMB1, uma origem EBV e o gene de resistência Amp.

[000468] A região correspondente a LC anti-TFPI4F36A1B2 completo (incluindo a sequência do peptídeo sinal original) foi amplificada por PCR dos clones de sequenciamento TOPO originais usando iniciadores específicos para as sequências N e C-terminais. O iniciador sentido continha umas sequências de sítio de restrição HindIII terminais para fins de clonagem e uma sequência Kozak (5'-GCCGCCACC-3') imediatamente a montante do códon de partida ATG. O iniciador antissentido continha um códon de parada seguido por uma sequência de sítio de restrição XbaI, imediatamente a jusante da sequência de codificação. O fragmento de PCR gerado foi digerido com restrição, clonado em sítio múltiplo de clonagem (MCS) de um vetor baseado em pTT linearizado e transformado em E. coli para seleção. A sequência do construto final foi verificada pelo sequenciamento de DNA.

[000469] A região correspondente ao domínio VH (incluindo a sequência do peptídeo sinal original) foi amplificada por PCR dos clones de sequenciamento TOPO originais usando iniciadores específicos para a sequência N-terminal e sequência de transição VH/CH. O iniciador sentido continha umas sequências de sítio de restrição NotI terminais para fins de clonagem e uma sequência Kozak (5'-GCCGCCACC-3') imediatamente a montante do códon de partida

ATG. O iniciador antissentido continha um sítio de restrição NheI na estrutura a jusante da transição VH/CH. O fragmento de PCR de domínio VH gerado foi digerido com restrição, clonado em um vetor linearizado contendo a sequência de domínio CH de uma IgG1 murina e transformado em *E. coli* para seleção. A sequência do construto final foi verificada por sequenciamento de DNA.

[000470] O anticorpo anti-TFPI4F36A1B2 clonado e expresso recombinantemente tinha o mesmo perfil e afinidade em todo o ensaio usado, como o anticorpo derivado do hibridoma original. Procedimentos usados para a expressão transiente em células HEK293-6E são descritos no exemplo 3.

Exemplo 3: Desenho e construção de um mAb TFPI4F36 humanizado

[000471] As sequências da CDR anti-TFPI4F36A1B2 de camundongo foram anotadas de acordo com a definição de Kabat e encontradas sendo como se segue:

[000472] CDR-H1: NYAMS (aminoácidos 31 a 35 da SEQ ID NO: 8).

[000473] CDR-H2: TISRSGSYSYFPDSVQG (aminoácidos 50 a 66 da SEQ ID NO: 8).

[000474] CDR-H3: LGGYDEGDAMDS (aminoácidos 99 a 110 da SEQ ID NO: 8).

[000475] CDR-L1: KSSQSLLESDGKTYLN (aminoácidos 24 a 39 da SEQ ID NO: 4).

[000476] CDR-L2: LVSILDS (aminoácidos 55 a 61 da SEQ ID NO: 4).

[000477] CDR-L3: LQATHFPQT (aminoácidos 94 a 102 da SEQ ID NO: 4).

[000478] Um modelo 3D de anti-TFPI4F36A1B2 foi construído no Modeller (www.salilab.org/modeller) baseado nos moldes estruturais 2GJJ (mAB contra Her2erbb2) e 1X9Q (hAB contra fluoresceína).

[000479] Uma pesquisa de BLASTp em um banco de dados de

linhagem germinativa humana V com a VL e VH anti-TFPI4F36A1B2 devolveu as quatro seguintes sequências de linhagem germinativa potenciais:

Cadeia pesada: VH3_21 ou VH7183.9 (valores E <1e-45)

Cadeia leve: VKII_A18 ou VKII_A1 (valores E <3e-45)

[000480] Após inspeção manual de acertos e alinhamentos, as sequências de linhagem germinativa VH3_21 e VKII_A18 foram selecionadas como regiões conservadas de humanização HC e LC, respectivamente. Os segmentos J de linhagem germinativa correspondentes foram selecionados baseados no alinhamento de sequência como JH6 e JK4. O alinhamento entre anti-TFPI4F36A1B2 e as sequências de linhagem germinativa selecionadas é mostrado em combinação com a versão enxertada da primeira CDR de TFPI4F36 humanizado. A identidade de sequência entre anti-TFPI4F36A1B2 e as estruturas humanas (HC: VH3_21/JH6 e LC: VKII_A18/JK4) é muito alta como ilustrado por asteriscos abaixo da sequência. Cada asterisco marca uma posição da identidade de sequência. O construto de VH inicial humanizado foi desenhado de acordo com uma estratégia de enxerto de CDR mínima, na qual CDR-H2 é enxertada em uma versão mais curta (resíduo 50 a 58) do que a definição de Kabat (resíduo 50 a 66). O restante de 5 CDRs foi enxertado de acordo com a definição de Kabat. As CDRs (definição de Kabat) são listadas como enxertadas abaixo; os resíduos mostrados em negrito para CDR-H2 são resíduos de linhagem germinativa humana.

[000481] CDR-H1: NYAMS (aminoácidos 31 a 35 da SEQ ID NO: 18).

[000482] CDR-H2: TISRSGSYSYYADSVKG (aminoácidos 50 a 66 da SEQ ID NO: 28).

[000483] CDR-H3: LGGYDEGDAMDS (aminoácidos 99 a 110 da SEQ ID NO: 18).

[000484] CDR-L1: KSSQSLLESDGKTYLN (aminoácidos 24 a 39 da SEQ ID NO: 15).

[000485] CDR-L2: LVSILDS (aminoácidos 55 a 61 da SEQ ID NO: 15).

[000486] CDR-L3: LQATHFPQT (aminoácidos 94 a 102 da SEQ ID NO: 15).

[000487] A composição de CDR-H2 no HzTFPI4F36 final humanizado variante é listada abaixo e combinado com CDR-H2 listada para o anticorpo anti-TFPI4F36A1B2 de camundongo.

[000488] CDR-H2: TISRSGSYSYFPDSVQG (aminoácidos 50 a 66 da SEQ ID NO: 18).

[000489] A Figura 1 mostra as sequências de domínios VH (A) e VL (B) de anti-TFPI4F36A1B2 de camundongo (SEQ ID NOs: 8 e 4, respectivamente) alinhadas com sequências de linhagem germinativa humana (SEQ ID NOs: 32 e 31, respectivamente) e sequências de CDR enxertadas TFPI4F36 humanizadas (SEQ ID NOs: 28 e 26, respectivamente). A numeração do esquema de Kabat é usada, como mostrado acima das sequências na Figura, e CDRs de acordo com a definição de Kabat são mostradas em negrito. Diferenças nas regiões conservadas entre anti-TFPI4F36A1B2 de camundongo e as sequências de linhagem germinativa são destacadas em cinza na sequência anti-TFPI4F36A1B2. Os asteriscos indicam posições da identidade de sequência entre TFPI4F36 de camundongo e sequências de linhagem germinativa humana. Potenciais retromutações são destacadas em cinza na sequência HzTFPI4F36-CDR enxertada (listada como hz4F36CDR enxertada).

[000490] Potenciais retromutações para os construtos HzTFPI4F36-CDR enxertadas foram identificadas baseadas nas diferenças posicionais encontradas nas regiões conservadas de TFPI4F36 de camundongo e a sequência de linhagem germinativa. A Figura 1 3D

mostra que o modelo de sequências do fragmento Fab de TFPI4F36 também foi usado para identificar e priorizar potenciais retromutações. As listas de retromutações geradas em LC e HC de TFPI4F36 humanizado são mostradas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Geração de vetores de expressão para TFPI4F36 humanizado

[000491] Sequências de DNA para regiões VH e VL de TFPI4F36 humanizado foram sintetizadas (GENEART AG) de acordo com o desenho de humanização do anticorpo descrito acima. As sequências foram obtidas com o enxerto de CDR mínimo básico e nenhuma retromutação adicional. As respectivas sequências de peptídeo líder de linhagem germinativa LC e HC foram incluídas nos construtos bem como uma sequência Kozak (5'-GCCGCCACC-3') imediatamente a montante do códon de partida ATG.

[000492] Vetores de expressão baseados em pTT foram gerados para expressão transiente do anticorpo TFPI4F36 humanizado como um isotipo capa/IgG4(S241P) humano. A mutação de prolina na posição 241 (numeração de acordo com Kabat, correspondente ao resíduo 228 pelo sistema de numeração UE (Edelman G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA 63, 78-85 (1969)) foi introduzido na região de dobradiça de IgG4 para eliminar formação de fragmentos de anticorpo monoméricos, isto é "meio-anticorpos" compreendendo uma LC e uma HC.

[000493] O fragmento VH foi extirpado do vetor de clonagem GENEART e clonado em um vetor baseado em pTT linearizado contendo a sequência de um domínio CH de IgG4(S241P) humana posteriormente transformado em *E. coli* para seleção. A sequência do construto final foi verificada por sequenciamento de DNA. O fragmento VL foi extirpado do vetor de clonagem GENEART e clonado em um vetor baseado em pTT linearizado contendo a sequência de um

domínio CL de capa humano e posteriormente transformado em E. coli para seleção. A sequência do construto final foi verificada por sequenciamento de DNA.

[000494] As sequências de ácido nucleico e aminoácidos para a VL, VH, LC e HC do anticorpo monoclonal HzTFPI4F36 enxertado por CDR (sequência de peptídeo sinal omitida) são fornecidas na listagem de sequência (SEQ ID NOs: 26 a 30).

Geração de vetores de expressão para TFPI4F36 quimérico de camundongo / ser humano

[000495] Para permitir a melhor avaliação possível das variantes TFPI4F36 humanizadas, uma versão de quimera de camundongo / versão de quimera humana do anticorpo anti-TFPI4F36 (ChimTFPI4F36) foi construída a fim de eliminar qualquer diferença relacionada à origem de região constante e isotipo. Vetores de expressão baseados em pTT foram gerados para a expressão transiente do anticorpo anti-TFPI4F36 quimérico com domínios variáveis murinos nas estruturas de isotipo capa/IgG4(S241P) humano.

[000496] A região correspondente ao domínio VH foi amplificada por PCR a partir de um plasmídeo de expressão anti-TFPI4F36A1B2 HC usando um iniciador específico pTT genérico e um iniciador específico para o C-terminal de domínio VH. O iniciador sentido é específico para o trecho de sequência a montante do sítio de restrição HindIII e o códon de partida ATG. O iniciador antissentido continha um sítio de restrição NheI na estrutura na sequência de transição VH/CH. O fragmento de PCR gerado foi digerido com restrição, clonado em um vetor baseado em pTT linearizado contendo a sequência de um domínio IgG4 (S241P) CH humano e posteriormente transformado em E. coli para seleção. A sequência do construto final foi verificada por sequenciamento de DNA.

[000497] A região correspondente ao domínio VL foi amplificada por PCR de um plasmídeo de expressão TFPI4F36A1B2 LC usando um iniciador específico pTT genérico e um iniciador específico para o C-terminal de domínio VL. O iniciador sentido é específico para o trecho de sequência a montante do sítio de restrição HindIII e o códon de partida ATG. O iniciador antissentido continha um sítio de restrição BsiWI na estrutura na sequência de transição VL/CL. O fragmento de PCR gerado foi digerido com restrição, clonado em um vetor baseado em pTT linearizado contendo a sequência de um domínio CL capa humano e posteriormente transformado em E. coli para seleção. A sequência do construto final foi verificada por sequenciamento de DNA.

Expressão recombinante de variantes de mAb

[000498] As variantes de anticorpo anti-TFPI4F36A1B2 murino, anti-TFPI4F36 quimérico e TFPI4F36 humanizado foram expressas transientemente em células HEK293-6E após um protocolo de expressão de anticorpo genérico. O seguinte procedimento descreve o protocolo de transfecção genérico usado para suspensão de células HEK293-6E adaptadas.

Manutenção celular

[000499] Células HEK293-6E foram cultivadas na suspensão em meio de expressão FreeStyle™ 293 (Gibco) suplementado com Geneticina 25 µg/mL (Gibco), 0,1% v/v do tensoativo Pluronic F-68 (Gibco) & Penicilina-Estreptomicina 1% v/v (Gibco). Células foram cultivadas em frascos de agitador Erlenmeyer em incubadoras de agitador a 37°C, CO_2 8% e 125 rpm e mantidas em densidades celulares entre 0,1 a 1,5 x 10^6 células/mL.

Transfecção de DNA

[000500] *A* densidade *celular de culturas usadas para transfecção foi 0,9 a 2,0 x 10^6 células/mL.*

[000501] Uma mistura de 0,5 µg de DNA vetor LC + 0,5 µg de DNA vetor HC foi usado por cultura *celular* mL.

[000502] O DNA foi diluído em meios Opti-MEM (Gibco) 30 µL de meios/µg de DNA, misturado e incubado à temperatura ambiente (23 a 25°C) por 5 min.

[000503] 293Fectin™ (Invitrogen) foi usado como reagente de transfecção em uma concentração de 1µl por µg de DNA.

[000504] O 293Fectin™ foi diluído 30X em meios Opti-MEM (Gibco), misturado e incubado à temperatura ambiente (23 a 25 °C) por 5 min.

[000505] As soluções de DNA e 293Fectin foram misturadas e repartidas para incubar à temperatura ambiente (23-25 °C) por 25 min.

[000506] A mistura de DNA-293Fectin então foi adicionada diretamente à cultura celular.

[000507] A cultura celular transfectada foi transferida para uma incubadora de agitador a 37°C, CO2 8% e 125 rpm.

[000508] 3 a 6 dias pós-transfecção, sobrenadantes de cultura celular foram coletados por centrifugação, seguida pela filtração através de um filtro PES 0,22 µm (Corning).

[000509] Análise quantitativa de produção de anticorpo foi realizada por Biolayer Interferometry diretamente em sobrenadantes de cultura celular clarificados usando o sistema FortéBio Octet e biosensores de proteína A ou HPLC em proteína A quantitativa.

Análises de atividade da variante enxertada de CDR de anti-TFPI4F36 humanizado

[000510] Humanização por enxerto de CDR mínimo resultou em uma perda dramática da afinidade causada pelo efeito tanto em taxa de associação como de dissociação. A afinidade de ligação do TFPI da versão inicialmente enxertada do anticorpo TFPI4F36 humanizado (HzTFPI4F36-CDRenxertado, na tabela 1 listada como TFPI4F36 Humanizado) foi pelo menos de 100 vezes menor que a afinidade de

~30 pM do anticorpo TFPI4F36 de camundongo original (ver tabela 1). Retenção de afinidade no anticorpo quimérico confirmou que capa/IgG4(S241P) FC humano não tinha efeito na afinidade de anticorpo. As análises de afinidade foram feitas usando SRP como descrito abaixo.

Tabela 1

mAB	**ka (1/Ms)**	**kd (1/M)**	**KD (M)**
TFPI4F36 murino	4,70E+06	1,33E-04	2,82E-11
TFPI4F36 quimérico	8,88E+06	1,44E-04	1,62E-11
TFPI4F36 humanizado	1,07E+06	2,21E-03	2,06E-09

Análise de Ressonância de Plásmons de Superfície (Biacore) de interação hzTFPI4F36-TFPI

[000511] Os parâmetros cinéticos para a interação de TFPI humano recombinante ao anti-TFPI4F36A1B2 murino original, anti-TFPI4F36 quimérico, e várias variantes do anticorpo TFPI4F36 humanizado foram determinados pela análise por SPR em Biacore, usando duas abordagens diferentes. Estudos de avaliação de cinética iniciais foram baseados em um procedimento de captura de mAbs purificados como descrito no exemplo 1. Estes foram seguidos por um procedimento cinético de ligação direta em construtos de mAb selecionados, com o anticorpo monoclonal acoplado covalentemente através de grupos amina livres à membrana de dextrana carboximetilada (CM5) na superfície do chip sensor. TFPI humano recombinante foi injetado em várias concentrações, seguidas por um período de dissociação com o fluxo tamponado constante sobre superfície do chip sensor como descrito no exemplo 8.

Mutagênese sítio-dirigida para introduzir retromutações em mAb humanizado

[000512] Baseada na baixa afinidade da versão enxertada de CDR de anti-TFPI4F36 humanizado, uma série de 27 mutações reversas

humanas-para-camundongo (referidas como retromutações) foi gerada na cadeia leve (LC) e cadeia pesada (HC) de HzTFPI4F36-CDR enxertado. Estes mutantes foram expressos, purificados e analisados por Biacore, como mutantes separados ou como mutantes de combinação de LC/HC. As listas de mutações geradas são mostradas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

[000513] Mutagênese sítio-dirigida foi realizada para introduzir mutações reversas humanas-para-camundongo (daqui em diante referida como retromutações) nos resíduos específicos em construtos LC/HC HzTFPI4F36-CDRenxertados como destacado no desenho de humanização. Mutações foram introduzidas por dois métodos diferentes:

1) Conjuntos de Mutagênese Sítio-dirigida ou Multi Sítio-dirigida QuickChange® de Stratagene foram usados para introduzir mutações pontuais e mutações de combinação. Os conjuntos foram usados de acordo com o protocolo do fabricante.

2) Métodos de PCR de sobreposição de 2 etapas padrão também foram usados para introduzir mutações pontuais e para gerar mutações de combinação.

[000514] Os plasmídeos de expressão LC e HC de HzTFPI4F36-CDRenxertado foram usados como moldes para os primeiros ciclos de mutagênese. Em ciclos subsequentes, as mutações também foram introduzidas usando plasmídeos anteriormente mutados como molde. As sequências de todos os construtos finais foram verificadas por sequenciamento de DNA.

Tabela 2: Variantes mutadas da cadeia leve enxertada de HzTFPI4F36-CDR

LC mutantes	**Mutações**	**K_D (M)**
HzTFPI4F36 LC-**S63T**	S63T	7,8E-9
HzTFPI4F36 LC-**P15I**	P15I	17,0E-9

LC mutantes	**Mutações**	**K_D (M)**
HzTFPI4F36 LC-**FR2**	Y36L, K39R, Q42E, Q45K	6,3E-10
HzTFPI4F36 LC-**P15I, FR2**	P15I, Y36L, K39R, Q42E, Q45K	6,4E-10
HzTFPI4F36 LC-**Y36L**	Y36L	>3E-11
HzTFPI4F36 LC-**K39R, Q42E,Q45K**	K39R, Q42E, Q45K	>3E-11

Tabela 3: Variantes mutadas da cadeia pesada enxertada de HzTFPI4F36-CDR

HC mutantes	**Mutações**	**K_D (M)**
HzTFPI4F36 HC-**Q3E**	Q3E	5,8E-9
HzTFPI4F36 HC-**G44R**	G44R	2,3E-9
HzTFPI4F36 HC-**S49A**	S49A	3,0E-9
HzTFPI4F36 HC-**Y59F**	Y59F	5,5E-9
HzTFPI4F36 HC-**A60P**	A60P	2,2E-9
HzTFPI4F36 HC-**K64Q**	K64Q	2,5E-9
HzTFPI4F36 HC-**S77T**	S77T	1,5E-9
HzTFPI4F36 HC-**A93T**	A93T	2,7E-9
HzTFPI4F36 HC-**Y59F, A60P**	Y59F,A60P	2,3E-9
HzTFPI4F36 HC-**KABAT CDR2**	Y59F, A60P, K64Q	9,0E-10
HzTFPI4F36 HC-**FR2, S49A**	A40T, G42E, G44R, S49A	1,3E-9
HzTFPI4F36 HC-**FR3**	N82aS, A84S, V89M	5,3E-9
HzTFPI4F36 HC-**FR3, S77T**	S77T, N82aS, A84S, V89M	7,7E-9
HzTFPI4F36 HC-**FR3, A93T**	N82aS, A84S, V89M, A93T	4,1E-9
HzTFPI4F36 HC-**FR2**	A40T, G42E, G44R	8,8E-10
HzTFPI4F36 HC-**FR2, S49A, CDR2**	A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q	2,6E-11
HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, CDR2**	G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q	3,9E-11
HzTFPI4F36 HC-**FR2, CDR2**	A40T, G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q	>3E-11
HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, S49A CDR2**	G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q	>3E-11

HC mutantes	Mutações	K_D (M)
HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, A60P, K64Q**	G42E, G44R, A60P, K64Q	9,3E-11
HzTFPI4F36 HC-**G44R, A60P, K64Q**	G44R, A60P, K64Q	3,0E-11

[000515] As mutações tanto em LC como em HC como listadas nas tabelas 2 e 3 são constantemente numeradas de acordo com a numeração do esquema de Kabat como mostrado na Figura 1.

[000516] Os mutantes LC listados na tabela 2 foram expressos como mutantes LC somente em conjunto com HC HzTFPI4F36 CDRenxertado selvagem. Os mutantes HC listados na tabela 3 foram expressos como mutantes HC somente em conjunto com LC HzTFPI4F36 CDRenxertado selvagem. Mutantes de combinação LC-HC também foram expressos combinando mutantes LC e HC diferentes. Mutantes são constantemente chamados após a cadeia mutada, isto é, a variante mAb final humanizada é expressa com LC HzTFPI4F36-CDRenxertado selvagem e o HC HzTFPI4F36 mutado **FR2, S49A, CDR2**. Expressão de HEK293-6E transiente foi realizada como descrito acima.

[000517] O conjunto inicial de 9 mutantes pontuais (HzTFPI4F36 LC-**S63T &** HzTFPI4F36 HC-**Q3E; G44R; S49A**; **Y59F**; **A60P**; **K64Q**; **S77T**; **A93T**) foram baseados em um conjunto primário de retromutações destacadas no desenho de humanização. Nenhum dos mutantes pontuais resgatou a afinidade do anticorpo, entretanto mutações na segunda região de estrutura da cadeia pesada humana (FR2, entre CDR H1 e CDR H2) e na região C-terminal da CDR H2 (omitido no esquema de enxerto de CDR mínimo) foram destacadas como sendo importantes para a ligação de TFPI. Medidas de afinidade por análises de Biacore foram realizadas como descrito acima.

[000518] Os ciclos subsequentes de mutagênese incluíram diversos mutantes de trecho nos quais todos os resíduos em regiões individuais

foram mutados coletivamente. O mutante HzTFPI4F36 HC-**Kabat CDR2**, tem 3 mutações Y59F, A60P, K64Q na região C-terminal da CDR H2, que corresponde ao enxerto de CDR H2 de acordo com a definição de Kabat e não de acordo com o esquema de enxerto de CDR mínimo usado para a variante HzTFPI4F36-CDRenxertada inicial. Este mutante de trecho junto com mutantes de trecho em LC FR2 e HC FR2 melhorou a afinidade do anticorpo TFPI4F36 humanizado significativamente, mas nenhum dos três mutantes de trecho individualmente restaurou a alta afinidade de TFPI4F36.

[000519] O mutante HC com mutações combinadas em HC FR2, e CDR2 (A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q) realmente restaurou a afinidade completamente. Este mutante introduziu 7 resíduos murinos adicionais na sequência de anticorpo. A combinação de mutantes LC FR2 (tanto **mutações FR2 como Y36L)** e HC FR2 e/ou mutantes de CDR2 também resultou em mutantes de alta afinidade. Entretanto a combinação destes mutantes LC/HC constantemente resultou em rendimentos de expressão mais baixos em comparação com os mutantes HC sozinhos. Estes resultados indicaram que a inclusão dos mutantes LC tinha um impacto negativo na estabilidade destas variantes de anticorpo, por isso sugerindo que um modelo de interação delicado entre o TFPI4F36 humanizado LC e HC exista.

[000520] Na última série de mutantes, as 7 mutações em HC FR2, e CDR2 (A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q) foram dissecadas a fim de eliminar retromutações potencialmente não contribuintes. Uma série de 5 mutantes foi gerada para visar este ponto.

[000521] Em 3 mutantes, as retromutações foram excluídas em FR2:

HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, CDR2**

HzTFPI4F36 HC-**FR2, CDR2**

HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, S49A CDR2**

[000522] Em 2 mutantes, as mutações adicionais em CDR2 também foram eliminadas:

HzTFPI4F36 HC-**G44R, A60P, K64Q**

HzTFPI4F36 HC-**G42E, G44R, A60P, K64Q**

[000523] Nenhum dos mutantes, entretanto, esteve em paridade com o mutante CDR2 HC FR2 combinado. Afinidade ou níveis de expressão (ou ambos) foram impactados por qualquer redução do subconjunto mutante CDR2 HC FR2. Os dois mutantes HzTFPI4F36 HC G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q com 5 retromutações restantes e HzTFPI4F36 HC G42E, G44R, A60P, K64Q com 4 retromutações residuais foram escolhidos para a comparação completa com HzTFPI4F36 HC-FR2, S49A, CDR2.

[000524] HzTFPI4F36 HC-G42E, G44R, A60P, K64Q e HzTFPI4F36 HC-FR2, S49A, CDR2 expressou em níveis comparáveis, enquanto HzTFPI4F36 HC-G42E, G44R, CDR2 tinha um nível de expressão levemente mais baixo. Estudos de estabilidade biofísica acelerada não mostraram diferença na estabilidade nas três variantes.

[000525] As afinidades medidas por Biacore são listadas abaixo.

[000526] Eficácia in vivo medida no ensaio de dPT (como descrito abaixo) foram comparáveis para as três variantes.

[000527] Tabela 4: parâmetros cinéticos para a interação entre TFPI e variantes TFPI4F36 humanizadas.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos da interação entre TFPI e variantes de TFPI4F36 humanizadas.

Mutante	**K_D (pM)**	**Rendimento da expressão (mg/L)**	**Número de retromutações**
HzTFPI4F36 A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q	26	54	7
HzTFPI4F36 G42E, G44R, Y59F, A60P, K64Q	39	24	5
HzTFPI4F36 G42E, G44R, A60P, K64Q	93	53	4

[000528] Com base nos dados descritos acima, a HC FR2 original, e mutante CDR2 com 7 retromutações HC (A40T, G42E, G44R, S49A, Y59F, A60P, K64Q) testaram superior a outras variantes; esta variante é neste pedido referida como HzTFPI4F36 ou como mAbTFPI2021.

[000529] É provável que as mutações de CDR2 Y59F, A60P, K64Q afetem a afinidade de anticorpo interagindo diretamente com o antígeno. Mutações A40T, G42E, G44R residem em um deslocamento de FR2 que conecta CDRH1 e CDR H2, remoto da face de ligação a antígeno e podem ser equilibrados para estabilizar interações LC-HC. A mutação S49A é inserida no meio de um grupo altamente hidrofóbico de cadeias laterais que podem explicar porque alanina é preferencial sobre serina nesta posição de maneira interessante, por isso, a alta afinidade de HzTFPI4F36 é obtida como uma combinação de mutações que melhoram a interação de antígeno direta e mutações remotas da região de ligação a antígeno que estabilizam o anticorpo.

[000530] Finalmente, HzTFPI4F36 tem uma afinidade (K_D) de ~25 pM e contém 35 resíduos de aminoácidos derivados da sequência de anticorpo de camundongo, correspondente a 5,2% do número total de resíduos no anticorpo.

[000531] As sequências de aminoácidos da região variável leve (VL), região variável pesada (VH), cadeia leve e cadeia pesada de um construto humanizado selecionado, HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021), são mostradas nas SEQ ID NOs: 15, 18, 21 e 24, respectivamente.

Ensaios *in vitro* de eficácia

[000532] O anticorpo anti-TFPI4F36 é capaz de neutralizar a inibição mediada por TFPI do fator de coagulação Xa (FXa) e o complexo de fator tecidual (TF) e fator VIIa (FVIIa). As atividades de variantes de anticorpo TFPI4F36 murino e humanizado foram medidas em um teste de tempo de protrombina diluída (dPT). O ensaio de dPT foi usado para medida da atividade pró-coagulante de anticorpos anti-TFPI.

Aumento das concentrações plasmáticas do anticorpo anti-TFPI encurta o tempo de coagulação dPT.

Exemplo 4: Purificação, cristalização e estrutura do fragmento Fab de MuTFPI4F36 (Fab) e o segundo domínio Kunitz (K2) de Inibidor da Via de Fator Tecidual Humano (TFPI)

[000533] Um fragmento de TFPI incluindo seu segundo domínio de Kunitz (K2) e uma marcação His6 de C-terminal (SEQ ID NO: 2) foi cocristalizado com o fragmento Fab MuTFPI4F36 (Fab). A estrutura do complexo foi resolvida por cristalografia de raio x. Foi encontrado que o epitopo de ligação K2 era composto de resíduos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 e L50. Foi encontrado que o parátopo no Fab compreendia resíduos E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 e F99 da cadeia leve MuTFPI4F36 (SEQ ID NO: 4) e resíduos N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 e D106 da cadeia pesada MuTFPI4F36 (SEQ ID NO: 8).

Materiais e Métodos

Cromatografia por Exclusão de Tamanho Analítica.

[000534] Cromatografia por exclusão de tamanho analítica (SEC) foi realizada usando uma coluna Biosep S-3000 (300 x 7,80 mm) (Phenomenex) eluída com tampão PBS (fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 3 mM, pH 7,5) em uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min.

Preparação e Purificação do Complexo Fab/K2.

[000535] O complexo Fab/K2 foi preparado pela mistura de Fab (0,27mg/mL em tampão PBS, pH 7,4) e K2 (0,29 mg/mL em PBS, pH 7,4) em uma proporção molar de 1:1.5 (5,4 mg de Fab e 1,4 de mg K2). O complexo foi concentrado em um dispositivo de filtro centrífugo (Amicon, corte de pm 10 kD) a uma concentração de ~6,7 mg/mL. Para remover K2 em excesso, a amostra concentrada foi aplicada a uma coluna de filtração Superdex 75 (CV300) eluída em gel com tampão PBS, pH 7,4 em uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Frações

contendo o complexo Fab/K2 foram agrupadas e concentradas a uma concentração proteica de 9,2 mg/mL. Esta solução foi usada para cristalização.

Cristalização do Complexo Fab/K2.

[000536] O complexo Fab/K2 foi cristalizado como hastes pelo método de gota pendente usando uma solução precipitada contendo citrato de potássio tribásico 0,2 M (pH 8,0) e PEG 3.350 a 20% em p/v.

Determinação de Estrutura Cristalina.

[000537] A estrutura do complexo Fab/K2 foi resolvida pelo método de substituição molecular usando estruturas de PDB 1F8T e 1TFX como moldes para moléculas de Fab e K2, respectivamente.

Resultados

[000538] O complexo entre Fab e K2 foi preparado pela adição de excesso de K2 a uma solução de Fab. A Figura 6 mostra a formação de complexo monitorada pela cromatografia por exclusão de tamanho analítica (SEC). Este método separa moléculas de acordo com seu tamanho molecular com as maiores espécies que eluem antes que as menores. Os picos correspondentes a K2 e Fab foram bem separados devido à grande diferença no peso molecular (pm ~8 kDa e 48 kDa, respectivamente). A adição de K2 à solução de Fab resultou em deslocamento menor esperado na posição de pico em direção a tempos de retenção mais curtos. O complexo foi facilmente separado e obtido em forma pura pela separação de K2 em excesso usando SEC preparativo.

[000539] As condições para cristalização do complexo Fab/K2 foram rastreadas usando vários rastreamentos de cristalização comerciais. O método de gota pendente permitiu cristais em forma de haste adequados para análise de raio x de cristal único e a estrutura foi resolvida pelo método de substituição molecular usando estruturas depositadas no PDB como moldes. A Figura 7 mostra a estrutura total

do complexo Fab/K2. Exibidas são as cadeias leves e pesadas, constituindo a molécula Fab, e exibindo o enovelamento β-sanduíche esperado da imunoglobulina característico para moléculas de anticorpo. Também são mostradas as alças de CDR que entram em contato com o antígeno e definem a especificidade e afinidade do anticorpo.

[000540] O antígeno, K2, exibe a β-folha antiparalela única característica (β1 (I20-N26) e β2 (Q31-Y37)) e a α-hélice N-terminal (α1, L50-I56) que define o enovelamento de Kunitz (Figura 8). Também estão presentes hélices 3_{10} opcionais próximas ao N-terminal (α0, D5-F8) seguido pela alça 1 (L1, L9-Y19) levando a β 1, que é conectada à β2 através de uma alça curta (Lβ, N27-K30). No segmento C-terminal, a alça 2 (L2, G38-T49) conecta β2 com α1. Finalmente, três ligações dissulfeto características (C7-C57, C16-C40 e C33-C53) conectam α0 com α1, L1 com L2 e β2 com α1, respectivamente.

[000541] Duas estruturas de K2 foram depositadas no Banco de dados de Proteína Mundial (PDB). Uma estrutura, 1ADZ, é determinada por espectroscopia de NMR e representa a estrutura em solução livre, ao passo que a outra, 1TFX, é determinada pela cristalografia de raio x e representa K2 complexado com tripsina porcina. A Figura 9 mostra a superposição estrutural de K2 representada pela molécula 1ADZ, 1TFX e K2 no complexo com Fab. Os traços do esqueleto parecem muito similares entre as três estruturas, sugerindo que o enovelamento Kunitz com suas três ligações dissulfeto de estabilização seja bastante rígido.

Descrição do epitopo de ligação MuTFPI4F36 K2

[000542] O epitopo de ligação no antígeno K2, definido como resíduos em K2 contendo pelo menos um átomo pesado de cadeia lateral situado dentro de uma distância de 4 Å ou menos de um átomo

pesado em Fab, compreende resíduos E10, E11, P13, R17, Y19, T21, Y23, Q28, Q31, E33, R34, F35, K36 e L50 (Figura 10). Os resíduos de contato em K2 são localizados em L1 (E10, E11, P13, R17, Y19) estrutura de β-folha (T21, Y23, Q31, E33, R34, F35, K36) e a alça de conexão, Lβ (Q28) e, finalmente, um único α1 (L50). A Figura 10 representa o epitopo de ligação mapeado tanto na estrutura 3D de K2 como na sequência de aminoácidos primária.

Descrição do parátopo MuTFPI4F36

[000543] O parátopo no fragmento Fab MuTFPI4F36 foi determinado da mesma estrutura de raio x do complexo entre o Fab MuTFPI4F36 e o domínio K2 de TFPI. O parátopo foi definido como aqueles resíduos no Fab MuTFPI4F36 tendo um átomo pesado dentro de uma distância de menos de 4 Å de um átomo pesado no domínio K2. Os resíduos de contato na cadeia leve são localizados nos resíduos E31, S32, D33, Y37, A96, T97, H98 e F99 da SEQ ID NO: 4. Os resíduos de contato na cadeia pesada são localizados nos resíduos N31, R53, S54, S56, Y57, Y59, F60, P61, D62, Q65, Y102, D103 e D106 da SEQ ID NO: 8. A posição do parátopo é ilustrada na Figura 3.

Exemplo 5: Estrutura do complexo Fab K2/HzTFPI4F36

[000544] Usando metodologia similar áquela descrita para determinação da estrutura tridimensional de Fab MuTFPI4F36 ligado a K2, a estrutura do complexo entre o fragmento de Fab do anticorpo humanizado, HzTFPI4F36, e K2 foi determinada. Foi encontrado esperadamente que o Fab de HzTFPI4F36 ligava-se à mesma região em K2 que o Fab murino do qual é derivado. A similaridade total entre as estruturas dos dois complexos é evidente na Figura 11, onde traços de faixa do esqueleto são recobertos para complexos K2/TFPI4F36 Fab e K2/HzTFPI4F36 Fab. O epitopo (utilização definida de um corte 4 Å) em K2 foi, para HzTFPI4F36, encontrado compreender resíduos E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32,

E33, R34, K36 e L50. Em comparação com a estrutura de K2/MuTFPI4F36, os Fab de origem murina, D12, F24, N26 e C32 estão no complexo K2/HzTFPI4F36 humanizado dentro do corte 4 Å, ao passo que F35 está fora. Isto reflete diferenças menores em orientações da cadeia laterais dentro das interfaces de ligação dos complexos K2/Fab MuTFPI4F36 e Fab K2/HzTFPI4F36, apesar de que as regiões de CDR em MuTFPI4F36 e HzTFPI4F36 sejam idênticas.

Exemplos 6 a 8

[000545] A função de HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) foi comparada à função de todos (quatro) anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis, alguns dos quais são ditos para ligar ao domínio K2 de TFPI; alguns dos não foram descritos com respeito à ligação.

Exemplo 6: ensaio de neutralização de TFPI: inibição de FXa

[000546] Materiais usados foram tampão BSA no ensaio (Hepes 50 mM; NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, pH 7,4) e os reagentes mostrados na tabela 5.

Tabela 5: Materiais usados

Reagente	**Companhia/Referência**	**Concentração estoque**	**Concentração final (diluição em tampão BSA)**
FXa humano	Enzyme Research Laboratory	21,7 μM	5 nM
TFPI humano	Referência: Pedersen et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, p. 16786-16793	Liofilizado em glicilglicina a 10 mM, NaCl a 100 mM; tampão manitol a 165 mM pH 7,0. Reconstituído em água.	6 nM

Reagente	**Companhia/Referência**	**Concentração estoque**	**Concentração final (diluição em tampão BSA)**
mAbTFPI4F36 mAb0281 mAb4904 mAb2974 mAb29741	Presente invenção Ab systems AD R&D systems R&D systems		5 a 150 nM
S2765	Chromogenix	20 mM	1 mM

Método:

[000547] TFPI humano completo recombinante (concentração final 6 nM)) foi misturado no tampão BSA com concentrações crescentes do mAb de interesse (concentração final: 5 a 150 nM) por 30 min. FXa foi adicionado e incubado 30 min com mistura por outros 30 min. Substrato cromogênico S2765 foi adicionado e a absorção em 405 nm foi medida por 15 min em um Spectramax. Atividade 100% representa a atividade de FXa sem adição de TFPI.

Tabela 6: Neutralização da inibição de TFPI de FXa

Companhia	**mAb ID**	**IC_{50} nM**	**% de neutralização de TFPI em 150 nM**
Presente invenção	HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021)	12,6	100%
AbNova	mAb0281	nd	< 10%
American Diagnotica	mAb4904	nd	< 10%
R&Dsystems	mAb2974	29,4	90%
R&Dsystems	mAb29741	nd	< 10%

Conclusão:

[000548] Em 150 nM, HzTFPI4F36 (mAbTFPI 2021) neutralizou totalmente a inibição de TFPI de FXa. Quase nenhuma atividade foi detectada para mAb0281, mAb4904 e mAb29741.

Exemplo 7: ensaio de neutralização de TFPI: inibição de FVIIa/TF/FXa

[000549] Materiais usados foram tampão BSA (Hepes a 50 mM; NaCl a 0,1 M, $CaCl_2$ a 5 mM, BSA a 0,1 mg/mL, pH 7,4) EDTA: 50 mM e os reagentes listados na tabela 7.

Tabela 7

Reagente	**Companhia/Referência**	**Concentração Estoque**	**Concentração final (diluição em tampão BSA)**
MAB2974 mAbTFPI4F36	R&D systems *Presente invenção*	3330 nM 75300 nM	Variável (5 a 150 nM)
NovoSeven	Novo Nordisk	27 µM	1 pM
vesículas	Vesículas fosfolipídicas HTI catNo.PCPS-02 No.W1115-75% PC - 25% PS	2,0 mM	10 µM
S-2765	Chromogenix	35 mM	0,5 mM
FX	American Diagnostica inc. Fator bovino X Número do produto 510 Lote No. 050920 dissolvido em glicerol/água a 50%	165 µM	160 nM
TFPI	Referência: Pedersen et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, p. 16786-16793	18,6 µM	1 nM
TF (Innovin)	Dade BehringNo.2010-01-11No.536975 frasco diss. em 10mL de H2O	2,8 nM (6nM)	1 pM

Método:

[000550] Adicionar todos os componentes nas concentrações finais indicadas na tabela. Adicionar 25 µL de FX, 25 µL de mAb TFPI em

concentrações variadas, 25 µL de TFPI humano, 25 µL de FVIIa-TF (innovin) em poços de microtítulo. Incubação por 40 min à temperatura ambiente. Adicionar 50 µL de EDTA seguido por 50 µL de S-2765. Misturar e ler a placa por 15 min em 405 nm em Spectramax. Atividade 100% é a atividade de FVIIa/TF/FX obtida sem TFPI presente.

Tabela 8: Neutralização da inibição de TFPI de FVIIa/TF/FX

Companhia	**mAb ID**	**IC_{50}**	**% de neutralização de TFPI em 150 nM**
Presente invenção	HzTFPI4F36 (mAbTFPI2021)	3,8 nM	100%
AbNova	mAb0281	nd	Nd
American Diagnotica	mAb4904	nd	Nd
R&Dsystems	mAb2974	45,6 nM	53%
R&Dsystems	mAb29741	nd	Nd

Conclusão:

[000551] Em uma concentração de mAb de 150 nM, TFPI é totalmente neutralizado por mAbTFPI2021. mAb2974 também alcança a saturação mas não neutraliza totalmente TFPI (neutralização 53%).

Exemplo 8: análise de interação de ligação

[000552] Os materiais usados foram como listados na tabela 9.

Tabela 9

Reagente	**Companhia**
TFPI	Liofilizado em glicilglicina a 10 mM, NaCl a 100 mM; tampão manitol a 165 mM pH 7,0. Reconstituído em água.
mAbTFPI2021 mAb0281 mAb4904 mAb2974 mAb29741	*Presente invenção* Ab systems AD R&D systems R&D systems
Todos os outros reagentes	Biacore

Método:

[000553] Análise de interação de ligação foi obtida por Ressonância de Plásmons de Superfície em um instrumento Biacore T-100. Captura do anticorpo monoclonal relevante em uma concentração fixa foi obtida pela imobilização direta em um chip CM5 do mAb em um nível de 500-1000 RU em acetato de sódio 10 mM pH 4,5 a 5,0. Diluições de quatro vezes de TFPI completo humano recombinante ou forma curta de TFPI humano (1 a 161 resíduos de aminoácidos) de 200 nM a 0,2 nM foram testadas para ligar ao mAb imobilizado. Tampão de corrida e diluição: HEPES 10 mM, 150 mM, p20 0,005%, pH 7,4. Regeneração foi obtida por Glicina 10 mM, pH 1,7. Determinação de constantes cinéticas e de ligação (k_{on}, k_{off}, K_D) foi obtida assumindo uma interação 1:1 de TFPI e o anticorpo de interesse usando o programa de avaliação Biacore T100. Os resultados são mostrados na tabela 10. Competição dos diferentes mAbs para ligação a TFPI quando ligados a mAbTFPI2021 ("mAb2021", HzTFPI4F36) foi obtida por imobilização de mAbTFPI2021 a 5000 RU em um chip CM5 seguido por ligação de TFPI 50 nM seguido por concentrações variadas dos mAbs (2974, 0281, 4904, 29741) a serem testados para competição. Resultados são mostrados na tabela 11. Regeneração do chip foi obtida por Glicina 10 mM, pH 1,7.

Tabela 10: Análise de ressonância de plásmons de superfície (SPR). Ligação a TFPI humano de extensão total. Constantes cinéticas e de ligação.

Fabricante	**mAb ID**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**K_D (M)**	**K_D nM**
Presente invenção	mAb2021	2,39E+06	3,58E-05	1,50E-11	0,015
AbNova	mAb0281	3,99E+05	0,001436	3,60E-09	3,60
American Diagnotica	mAb4904	1,42E+05	00,1294	9,14E-09	9,14
R&Dsystems	mAb2974	1,39E+06	0,001202	8,64E-10	0,864

Fabricante	**mAb ID**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**K_D (M)**	**K_D nM**
R&Dsystems	mAb29741	9,51E+05	0,003165	3,33E-09	3,33

Tabela 11: Análise de SPR. Constante de ligação para ligação a TFPI humano de extensão total e $TFPI_{161}$(domínios K1 and K2). Competição com mABTFPI 2021.

Fabricante	**mAb ID**	**K_D (M) TFPI**	**K_D (M) $TFPI_{161}$**	**Competição com mAB 4F36**
Presente invenção	mAbTFPI2021	1,50E-11	4,55E-11	Sim
AbNova	mAb0281	3,60E-09	7,28E-09	Não
American Diagnotica	mAb4904	9,14E-09	Sem ligação	Não
R&Dsystems	mAb2974	8,64E-10	3,12E-09	Sim
R&Dsystems	mAb29741	3,33E-09	Sem ligação	Não

Conclusão

[000554] mAbTFPI2021 se liga a TFPI com uma afinidade mais alta do que qualquer um dos outros mAbs testados (K_D 15 pM). Somente o mAb2974 compete por ligação ao mesmo sítio que mAb TFPI4F36.

Exemplo 9: Neutralização de TFPI em células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs)

[000555] Células endoteliais expressam constitutivamente TFPI em uma forma que está ligada à superfície celular através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI). TFPI ancorado por GPI inibe especificamente a atividade mediada por TF quando TF é expresso na mesma célula que TFPI. Para demonstrar que HzTFPI4F36

(mAbTFPI2021) neutraliza a inibição por TFPI ligado à célula muito mais eficientemente que mAb 2974, aplicamos células endoteliais vasculares umbilicais humanas HUVECs; e a fim de induzir a expressão de TF, estas células foram estimuladas com TNFα (Sigma RBI) e IL1β (Roche) antes do teste de ativação catalisada por FVIIa/TF de FX.

[000556] Células HUVEC foram cultivadas à confluência em placas de 96 poços em meio EBM-2 (Clonetics) e estimuladas com TNFα 20 ng/mL e IL1β 20 ng/mL por 2 horas antes do teste. O teste foi realizado em HEPES 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3,5 mM, 5 mM CaCl, 1 mg/mL BSA (0,1%) ph 7,4, e a ativação de FX foi seguida na presença do anticorpo (0 a 20 nM) e com adição de FVIIa 50 pM e FX 50 nM. Geração de FXa foi medida com 0,6 mM de um substrato cromogênico, S-2765 (Chromogenix) e calibrada em direção a uma curva padrão de FXa.

[000557] A Figura 12 mostra os resultados quando a inibição por TFPI ligado à célula foi eliminado por 0 a 20 nM de HzTFPI4F36 ou mAb 2974. Ativação mediada por TF/FVIIa de FX foi estimulada por HzTFPI4F36 com meia concentração de efeito máximo, (EC50 ~ nM) ao passo que apenas alguma estimulação da geração de FXa foi observada com o mAb 2974 em 20 nM.

[000558] Dessa forma, este exemplo ilustra que HzTFPI4F36, ao contrário de mAb 2974, neutraliza eficientemente a inibição de ativação de FX mediada por TF/FVIIa por TFPI ligado à célula.

Exemplo 10: Neutralização de inibição de TFPI de atividade TF/FVIIa sobre células 231 MDA-MB de carcinoma de mama humano.

[000559] Células 231 MDA-MB expressam constitutivamente altos níveis de TF e quantidades insignificantes de TFPI na superfície. Ativação mediada por TF/FVIIa de superfície celular de FX pode ser

inibida por TFPI exógeno adicionado. Para demonstrar que HzTFPI4F36 neutraliza este tipo de inibição de TFPI muito mais eficientemente do que mAb 2974, aplicamos células 231 MDA-Mb e testamos a capacidade de várias concentrações do anticorpo para eliminar a inibição de TFPI da ativação catalisada por FVIIa/TF de FX.

[000560] Células 231 MDA-MB foram cultivadas à confluência em placas de 96 poços em DMEM Gibco catNo. 31966-021 fornecido com FCS 10% e P/S 1%. O teste foi realizado em HEPES 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3,5 mM, CaCl 5 mM, BSA 1 mg/mL (0,1%) pH 7,4, e ativação de FX foi seguida na presença do anticorpo (0 a 20 nM) e com adição de TFPI completo recombinante humano 2,5 nM, FVIIa 100 pM e FX 50 nM. Geração de FXa foi medida com 0,6 mM de um substrato cromogênico, S-2765 (Chromogenix). A absorvância em 405 nm foi medida continuamente e a atividade de FXa foi determinada pela medida da inclinação da curva de progresso em 15 min após início da reação.

[000561] A Figura 13 mostra os resultados quando a inibição por TFPI foi eliminada por 0 a 20 nM de HzTFPI4F36 ou mAb 2974. Ativação mediada por TF/FVIIa de FX foi estimulada por HzTFPI4F36 com meia concentração de efeito máximo, (EC_{50} ~ 2 nM) ao passo que a estimulação da geração de FXa foi obtida em uma concentração substancialmente mais alta de mAb 2974 (EC_{50} > 20 nM).

Exemplo 11: Mapeamento dos epitopos de ligação dos anticorpos monoclonais anti-TFPI, HzTFPI4F36 e mAb2974, usando ELISA.

[000562] O epitopo de ligação para HzTFPI4F36 no domínio Kunitz de TFPI 2 (K2) foi mapeado pela resolução da estrutura cristalina do complexo TFPI-K2/HzTFPI4F36. O efeito de mutação de resíduos de aminoácidos únicos em TFPI dentro (E10, R17 e Y19) e fora (D5) do epitopo de ligação de HzTFPI4F36 na afinidade de ligação a

HzTFPI4F36 e mAb2974 (R&D systems) foi analisado por ELISA. As variantes de TFPI foram expressas em células HEK293-F e os ELISAs foram realizados usando o meio condicionado das culturas celulares.

[000563] As concentrações de TFPI-WT e mutantes de TFPI foram estimados por um ELISA, que se ligam a TFPI K1 (MAb4903, American Diagnostica) e K3 (MAb4F110, interno) e por isso não é afetado pelas mutações. O efeito das mutações na ligação a HzTFPI4F36 foi analisado usando MAb4903 e HzTFPI4F36 no ELISA. O efeito sobre a ligação de MAb2974 foi determinado usando um ELISA com MAb2974 e MAb4F110.

[000564] Os efeitos das mutações em Kunitz TFPI-2 na ligação a HzTFPI4F36 e MAb2974 respectivamente, foram calculados em relação a TFPI-WT (ligação 100%) e ilustrados na Figura 14. Os números foram corrigidos para diferenças em níveis de expressão.

Conclusão:

[000565] A mutação de alanina dos três resíduos de aminoácidos dentro do epitopo de ligação de HzTFPI4F36 resultou na ligação reduzida a HzTFPI4F36, ao passo que a substituição de alanina do resíduo localizado fora do epitopo (TFPI-D5A) não tinha efeito. Somente um dos quatro mutantes de alanina, TFPI-Y19A, reduziu ligação a MAb2974.

[000566] Finalmente, HzTFPI4F36 e MAb2974 têm epitopos de ligação distintos mas ficam sobrepostos localizados em TFPI-Kunitz 2.

Exemplo 12: Estudos *in vivo*

[000567] Coelhos foram tornados transientemente hemofílicos pela administração intravenosa de 2000 RBU/kg de anticorpos anti-FVIII monoclonais. Após 10 minutos, os coelhos receberam 12000 U/kg de anticorpo anti-TFPI (4F36; 1,93 mg/kg). Hemorragia de cutícula foi induzida 45 minutos após administração de anticorpo anti-FVIII.

[000568] O anticorpo 4F36 causou uma redução significante do

tempo de sangramento de cutícula (Figura 15). Administração do anticorpo 4F36 não levou a diminuição significante no número de plaquetas (Figura 18).

[000569] Um experimento similar foi repetido no qual três grupos de oito coelhos transientemente hemofílicos receberam anticorpo controle de isotipo (grupo controle negativo), anti-TFPI 2 mg/kg (mAb 4F36) ou NovoSeven 9 mg/kg (grupo controle positivo) 5 minutos após a hemorragia de cutícula ser induzida. Resultados são ilustrados na Figura 16: administração de mAB 4F36 resultou em uma redução considerável em perda sanguínea (aproximadamente 85%) em todos os recipientes, demonstrando que mAb4F36 pode ser usado "sob demanda".

Exemplo 13: Estimativa de relação dose-efeito em coelho

[000570] A relação dose-efeito do mAb HzTFPI4F36 humanizado foi examinada em um modelo de hemofilia de coelho. Coelhos foram tornados hemofílicos transientes pela administração iv de um anticorpo anti-FVIII monoclonal. Após 10 minutos, os coelhos receberam 0,5, 1, 2 mg/kg de HzTFPI4F36 ou um anticorpo controle de isotipo. Após hemorragia de cutícula ser induzida por outros 35 minutos, seguida por um período de observação de 60 minutos, HzTFPI4F36 reduziu o tempo de sangramento significativamente e dependentemente de dose bem como a perda sanguínea ao aumentar a dose de 0,5 a 2 mg/kg (Figura 17). Dessa forma, uma redução significante tanto do tempo de sangramento como da perda sanguínea foi alcançada com HzTFPI4F36 1 mg/kg, correspondente a uma concentração plasmática de 18780 ng/mL de HzTFPI4F36. Normalização da hemorragia foi alcançada em 2 mg/kg, correspondente a uma concentração plasmática de 30980 ng/mL de HzTFPI4F36.

[000571] Estes dados indicam que a ‘concentração eficaz', por

exemplo, concentração plasmática necessária para normalização no presente modelo - de HzTFPI4F36 está na faixa de 18780 e 30980 ng/mL.

Exemplo 14: PK/PD em coelhos - 'Duração de Ação'

[000572] Um estudo farmacocinético de HzTFPI4F36 em coelhos dosados com 20 mg/kg foi realizado. Em pontos do tempo predeterminados durante o estudo, amostras de sangue foram tiradas dos coelhos para perfil farmacocinético por um ELISA medindo HzTFPI4F36 livre (mostrado na fig. 3 abaixo). Estudos de efeito foram realizados em 4 dias (96 horas), 7 dias (168 horas) e 10 dias (240 horas) após administração, usando o modelo de sangramento de cutícula em coelhos hemofílicos transientes, os pontos de tempo de efeito são indicados na Figura 19.

[000573] O perfil farmacocinético é bifásico indicativo da depuração mediada alvo. Dessa forma, acima da flexão da curva, mAb livre em excesso está presente (mABlivre> TFPItotal), abaixo da curva: mAblivre <TFPItotal. Em bom acordo com o perfil farmacocinético, tanto perda sanguínea como tempo de sangramento foi significativamente reduzido tanto em 4 como 7 dias após administração de HzTFPI4F36 20 mg/kg intravenosamente, ao passo que nenhum efeito significante foi observado após 10 dias (Figura 20).

[000574] Estes dados confirmam que a concentração plasmática eficaz de HzTFPI4F36 em um modelo de sangramento de cutícula em coelhos hemofílicos está entre 18780 e 30980 ng/mL que está perto do limite de saturação de TFPI (flexão da curva). Consequentemente, um dose iv. única de HzTFPI4F36 20 mg/kg reduziu o sangramento de cutícula por pelo menos 7 dias, que correspondeu ao período de tempo que a concentração plasmática esteve acima da 'concentração eficaz'

Exemplo 15: modelo farmacocinético baseado em

dados de PK de macaco

[000575] Uma avaliação farmacocinética foi feita baseada em um estudo farmacocinético em macacos, onde tanto doses únicas como múltiplas foram administradas (Figura 21). Os níveis de dose variaram de 2 a 200 mg/kg.

[000576] O perfil PK em macaco (20 mg/kg, painel superior) é similar ao coelho, que indica a presença da distribuição similar de endotélio solúvel e ligado a TFPI. Dessa forma, estes dados indicam que os dados de efeito de coelho podem ser empregados para predizer a faixa de efeito no macaco. Além disso, a afinidade de HzTFPI4F36 para humano, macaco e coelho TFPI é similar (o mesmo epitopo) e distribuição de tecido de TFPI similar nas três espécies permite predições de dose no macaco e no homem.

Exemplo 16: Simulações

[000577] Baseado no modelo apresentado acima, foi possível fazer uma série de simulações. O objetivo principal das simulações foi descrever o regime ótimo de dosagem em configuração de dose múltipla. A concentração alvo (TFPI) não era conhecida, mas os dados de efeito de coelho acima permitem à suposição que se o objetivo está perto da saturação em um nível de 30000 ng/mL, então o efeito completo em um modelo de sangramento é obtido. Por isso, o objetivo principal das simulações foi avaliar que níveis de dose durante o período do tempo levariam à saturação completa. A Figura 22 exibe uma simulação de 1 mg/kg administrado subcutaneamente. A Figura 23 mostra uma simulação de HzTFPI4F36 15 mg/kg (mAbTFPI 2021) administrado IV a cada terceira semana. A Figura 24 mostra uma simulação de HzTFPI4F36 20 mg/kg (mAbTFPI 2021) administrado IV a cada segunda semana.

[000578] Em suma, baseado nas simulações acima mencionadas, a seguinte predição de regime de dose pode ser feita para seres

humanos:

Tabela 12: Regime de dosagem

Tipo de dose	**Dose**	**Regime de dosagem**
adm S.c.	1 mg/kg	Todo 2º dia
adm I.v.	10 a 20 mg/kg	Toda 2ª a 4 ª semana

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal, caracterizado pelo fato de que é capaz de se ligar especificamente ao domínio K2 de TFPI, em que o dito anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epitopo compreendendo o resíduo R17 da SEQ ID NO: 2 e o KD do referido anticorpo é inferior a 0,8 nM, conforme determinado usando ressonância de plásmons de superfície;

em que a cadeia pesada do referido anticorpo compreende uma sequência de CDR3 dos aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente;

em que a cadeia pesada do referido anticorpo compreende ainda:

• uma sequência de CDR1 dos aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO: 18, em que um desses aminoácidos pode ser substituído por um aminoácido diferente; e

• uma sequência de CDR2 dos aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO: 18, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente;

e em que a cadeia leve do referido anticorpo compreende:

• uma sequência de CDR1 dos aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, em que um, dois ou três destes aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e

• uma sequência de CDR2 dos aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente; e

• uma sequência de CDR3 dos aminoácidos 94 a 102

(LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15, em que um ou dois desses aminoácidos podem ser substituídos por um aminoácido diferente.

2. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o KD do referido anticorpo é inferior a 0,7 nM, inferior a 0,6 nM, inferior a 0,5 nM, inferior a e 0,4 nM, inferior a 0,3 nM, inferior a 0,2 nM, inferior a 0,1 nM, inferior a 0,05 nM, inferior a 0,025 nM, conforme determinado usando ressonância de plásmons de superfície.

3. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve do dito anticorpo compreende os resíduos de aminoácidos:

- E, na posição correspondente à posição 31,
- S, na posição correspondente à posição 32,
- D, na posição correspondente à posição 33,
- Y, na posição correspondente à posição 37,
- A, na posição correspondente à posição 96,
- T, na posição correspondente à posição 97 e
- F, na posição correspondente à posição 99

da SEQ ID NO: 15;

e em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende os resíduos de aminoácidos:

- N, na posição correspondente à posição 31,
- R, na posição correspondente à posição 53,
- S, na posição correspondente à posição 54,
- Y, na posição correspondente à posição 57,
- Y, na posição correspondente à posição 59,
- F, na posição correspondente à posição 60,
- P, na posição correspondente à posição 61,
- D, na posição correspondente à posição 62,
- Q, na posição correspondente à posição 65,

- Y, na posição correspondente à posição 102,
- D, na posição correspondente à posição 103 e
- D, na posição correspondente à posição 106

da SEQ ID NO 18.

4. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a dita cadeia pesada compreende ainda um S na posição correspondente à posição 52 da SEQ ID NO: 18 e/ou em que a dita cadeia leve compreende ainda um H na posição correspondente à posição 98 da SEQ ID NO: 15 e a dita cadeia pesada compreende ainda um S na posição correspondente à posição 56 da SEQ ID NO: 18.

5. Anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a referida substituição de aminoácido é uma substituição conservativa.

6. Anticorpo monoclonal, caracterizado pelo fato de que é capaz de se ligar ao domínio Kunitz 2 (K2) do inibidor da via de fator tecidual (TFPI), em que a cadeia pesada do dito anticorpo compreende:

- uma sequência de CDR1 dos aminoácidos 31 a 35 (NYAMS) da SEQ ID NO:18e
- uma sequência de CDR2 dos aminoácidos 50 a 66 (TISRSGSYSYFPDSVQG) da SEQ ID NO:18, e
- uma sequência de CDR3 dos aminoácidos 99 a 110 (LGGYDEGDAMDS) da SEQ ID NO:18, e em que a cadeia leve do dito anticorpo compreende:
- uma sequência de CDR1 dos aminoácidos 24 a 39 (KSSQSLLESDGKTYLN) da SEQ ID NO: 15, e
- uma sequência de CDR2 de aminoácidos 55 a 61 (LVSILDS) da SEQ ID NO: 15, e
- uma sequência de CDR3 de aminoácidos 94 a 102

(LQATHFPQT) da SEQ ID NO: 15.

7. Anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve do dito anticorpo compreende a SEQ ID NO: 15 e a cadeia pesada do dito anticorpo compreende a SEQ ID NO: 18.

8. Anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve do dito anticorpo compreende a SEQ ID NO: 21 e a cadeia pesada do dito anticorpo compreende a SEQ ID NO: 24.

9. Anticorpo monoclonal, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que é capaz de neutralização da inibição de TFPI de FVIIa/TF/FXa ligado à membrana em pelo menos 55%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 65%, tal como pelo menos 70%, tal como pelo menos 75%, tal como pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 95%, tal como até 100%, tal como 100%, como medido em um ensaio de inibidor de FVIIa/TF/FXa, quando TFPI é saturado com o dito anticorpo.

10. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

11. Uso de um anticorpo monoclonal, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o referido uso é para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de um indivíduo com uma coagulopatia.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido indivíduo apresenta qualquer coagulopatia congênita, adquirida e/ou iatrogénica, tal como hemofilia A, com ou sem inibidores, e hemofilia B, com ou sem inibidores.

FIG. 1

A. Cadeia Pesada

```
          1         2         3          4         5          6
1234567890123456789012345678901234AB67890123456789012ABC34567890 <- Kabat
EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMS  WVRQTPEKRLEWVATISR  SGSYSYFP TFPI4F36
** ************** ********** * *   **** * * ****  **    *
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMN  WVRQAPGKGLEWVSSISS  SSSYIYYA VH3_21/JH6
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS  WVRQAPGKGLEWVSTISR  SGSYSYYA hz4F36CDRgraft

          7         8          9         10                  11
12345678901234567890ABC34567890123456789ABCDEFGHIJK1234567890
DSVQGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRLGGYDEGD       AMDSWGQGTSVTVSS
*** ************ ***** *** **** *** *                 ** ***** *****
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR                MDVWGQGTTVTVSS
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGYDEGD       AMDSWGQGTTVTVSS
```

B. Cadeia Leve

```
          1         2                  3         4         5         6
12345678901234567890123456789ABCDEF8901234567890123456789012345678901 <- Kabat
DIVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLES DGKTYLNWLLQRPGESPKLLIYLVSILDSGVPD TFPI4F36
********* **** ************** * ****** * ** ** ** **** **   ***** *
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHS DGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSSRFSGVPD VKII_A18/JK4
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLES DGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLVSILDSGVPD hz4F36CDRgraft

          7         8         9         10
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789
RFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQATHFP  QTFGGGTKLEIKR
** ****************** ***** *  * *   ******* ****
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP   TFGGGTKVEIKR
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQATHFP  QTFGGGTKVEIKR
```

FIG. 2

A

TFPI-4F36A1B2 VL (sequência nucleotídica e traduzida, peptídeo sinal omitido):

```
      D  I  V  M   T  Q  T   P  L  T   L  S  V  T   I  G  Q ·
  1 GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCACT TTGTCGGTTA CCATTGGACA
    CTATAACACT ACTGGGTCTG AGGTGAGTGA AACAGCCAAT GGTAACCTGT
    · P  A  S   I  S  C  K   S  S  Q   S  L  L   E  S  D  G ·
 51 ACCAGCTTCC ATCTCTTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA GAAAGTGATG
    TGGTCGAAGG TAGAGAACGT TCAGTTCAGT CTCGGAGAAT CTTTCACTAC
    · K  T  Y   L  N  W   L  L  Q  R   P  G  E   S  P  K
101 GAAAAACCTA TTTAAATTGG TTATTACAGA GGCCAGGCGA GTCTCCAAAG
    CTTTTTGGAT AAATTTAACC AATAATGTCT CCGGTCCGCT CAGAGGTTTC
     L  L  I  Y   L  V  S   I  L  D   S  G  V  P   D  R  F ·
151 CTCCTAATCT ATCTGGTGTC TATACTGGAC TCTGGAGTCC CTGACAGGTT
    GAGGATTAGA TAGACCACAG ATATGACCTG AGACCTCAGG GACTGTCCAA
    · T  G  S   G  S  G  T   D  F  T   L  K  I   S  R  V  E ·
201 CACTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTCAC GCTGAAAATC AGCAGAGTGG
    GTGACCGTCA CCTAGTCCCT GTCTAAAGTG CGACTTTTAG TCGTCTCACC
    · A  E  D   L  G  V   Y  Y  C  L   Q  A  T   H  F  P
251 AGGCTGAGGA TTTGGGAGTT TATTATTGTT TGCAAGCTAC ACATTTTCCT
    TCCGACTCCT AAACCCTCAA ATAATAACAA ACGTTCGATG TGTAAAAGGA
     Q  T  F  G   G  G  T   K  L  E   I  K  R
301 CAGACGTTCG GTGGCGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAACGG
    GTCTGCAAGC CACCGCCGTG GTTCGACCTT TAGTTTGCC
```

B

TFPI-4F36A1B2 VH (sequência nucleotídica e traduzida, peptídeo sinal omitido):

```
      E  V  E  L   V  E  S   G  G  G   L  V  K  P   G  G  S ·
  1 GAGGTGGAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTAGTGAAGC CTGGAGGGTC
    CTCCACCTCG ACCACCTCAG ACCCCCTCCG AATCACTTCG GACCTCCCAG
    · L  K  L   S  C  A  A   S  G  F   T  F  S   N  Y  A  M ·
 51 CCTGAAACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACTTTCAGT AACTATGCCA
    GGACTTTGAG AGGACACGTC GGAGACCTAA GTGAAAGTCA TTGATACGGT
    · S  W  V   R  Q  T   P  E  K  R   L  E  W   V  A  T
101 TGTCTTGGGT TCGCCAGACT CCGGAGAAGA GGCTGGAGTG GGTCGCAACC
    ACAGAACCCA AGCGGTCTGA GGCCTCTTCT CCGACCTCAC CCAGCGTTGG
     I  S  R  S   G  S  Y   S  Y  F   P  D  S  V   Q  G  R ·
151 ATTAGTCGTA GTGGTAGTTA CTCCTACTTT CCAGACAGTG TGCAGGGTCG
    TAATCAGCAT CACCATCAAT GAGGATGAAA GGTCTGTCAC ACGTCCCAGC
    · F  T  I   S  R  D  N   A  K  N   T  L  Y   L  Q  M  S ·
201 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CACCCTGTAC CTGCAAATGA
    TAAGTGGTAG AGGTCTCTGT TACGGTTCTT GTGGGACATG GACGTTTACT
    · S  L  R   S  E  D   T  A  M  Y   Y  C  T   R  L  G
251 GCAGTCTGCG GTCTGAGGAC ACGGCCATGT ATTATTGTAC AAGACTTGGG
    CGTCAGACGC CAGACTCCTG TGCCGGTACA TAATAACATG TTCTGAACCC
     G  Y  D  E   G  D  A   M  D  S   W  G  Q  G   T  S  V ·
301 GGTTACGACG AGGGGGATGC TATGGACTCC TGGGGTCAAG GAACCTCAGT
    CCAATGCTGC TCCCCCTACG ATACCTGAGG ACCCCAGTTC CTTGGAGTCA
    · T  V  S   S
351 CACCGTCTCC TCA
    GTGGCAGAGG AGT
```

FIG. 3

A

```
         1         2                  3         4         5         6
1234567890123456789012345678ABCDEF8901234567890123456789012345678901234567890 Kabat
DIVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLES DGKTYLNWLLQRPGESPKLLIYLVSILDSGVPD 4F36

         7         8         9          10        11        12
12345678901234567890123456789012345AB678901234567890123456789012345678901234 Kabat
RFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQATHFP  QTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ 4F36

    13        14        15        16        17        18        19
56789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 Kabat
LTSGGASVVCFLNNFYPRDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHN 4F36

        20        21
12345678901234567890123456 Kabat
SYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC 4F36
```

B

```
         1         2         3          4         5          6
12345678901234567890123456789012345AB678901234567890123456789012ABC34567890 Kabat
EVELVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMS  WVRQTPEKRLEWVATISR  SGSYSYFP 4F36

         7         8          9         10                  11
12345678901234567890123456789012ABC34567890123456789012345678901234567890ABCDEFGHIJK12345678901 Kabat
DSVQGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRLGGYDEGD       AMDSWGQGTSVTV 4F36

        12        13        14        15        16        17
23456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 Kabat
SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT 4F36

  18        19        20        21
789012345678901234567890123456789012345678 Kabat
LSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCG 4F36
```

FIG. 4

1 11 21 31 41 51
DSEEDEEHTI ITDTELPPLK LMHSF**CAFKA** **DDGPCKAIMK** **RFFFNIFTRQ** **CEEFIYGGCE**

61 71 81 91 101 111
GNQNRFESLE **ECKKMC**TRDN ANRIIKTTLQ QEKPDF**CFLE** **EDPGICRGYI** **TRYFYNNQTK**

121 131 141 151 161 171
QCERFKYGGC **LGNMNNFETL** **EECKNIC**EDG PNGFQVDNYG TQLNAVNNSL TPQSTKVPSL

181 191 201 211 221 231
FEFHGPSW**CL** **TPADRGLCRA** **NENRFYYNSV** **IGKCRPFKYS** **GCGGNENNFT** **SKQECLRAC***K*

241 251 261 271
KGFIQRISKG *GLIKTKRKRK* *KQRVKIAYEE* *IFVKNM*

FIG. 5

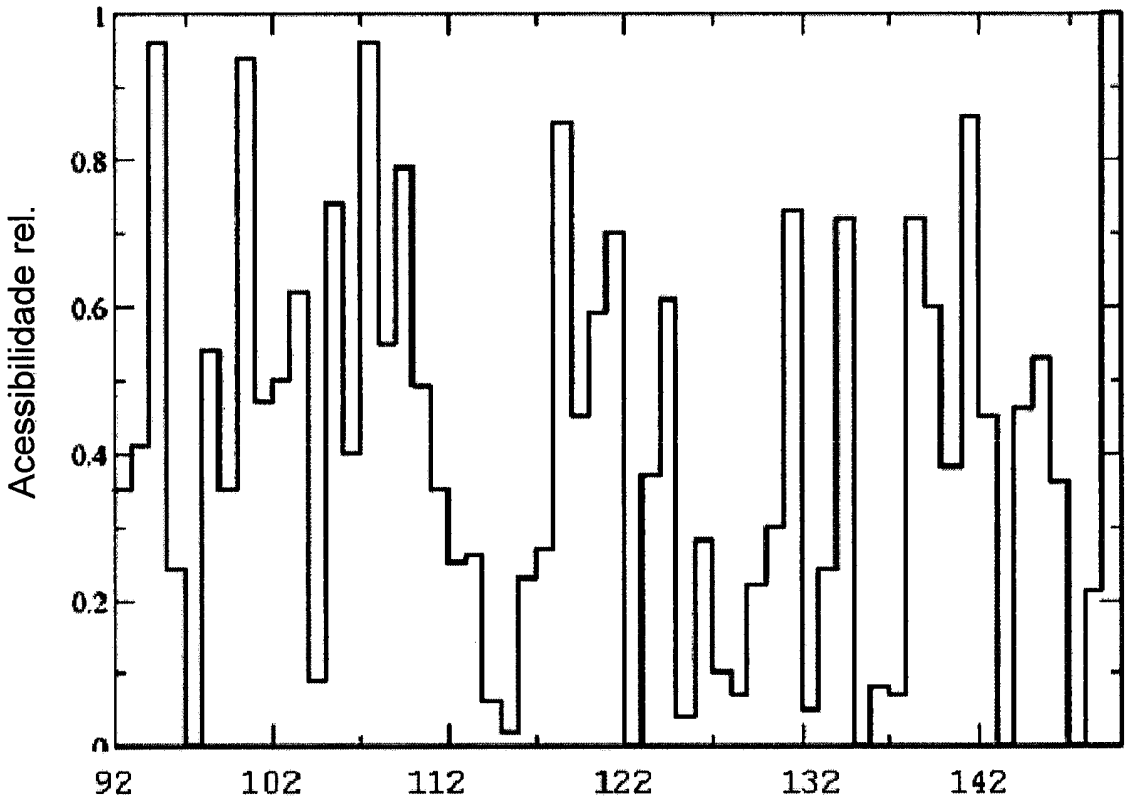


FIG. 6

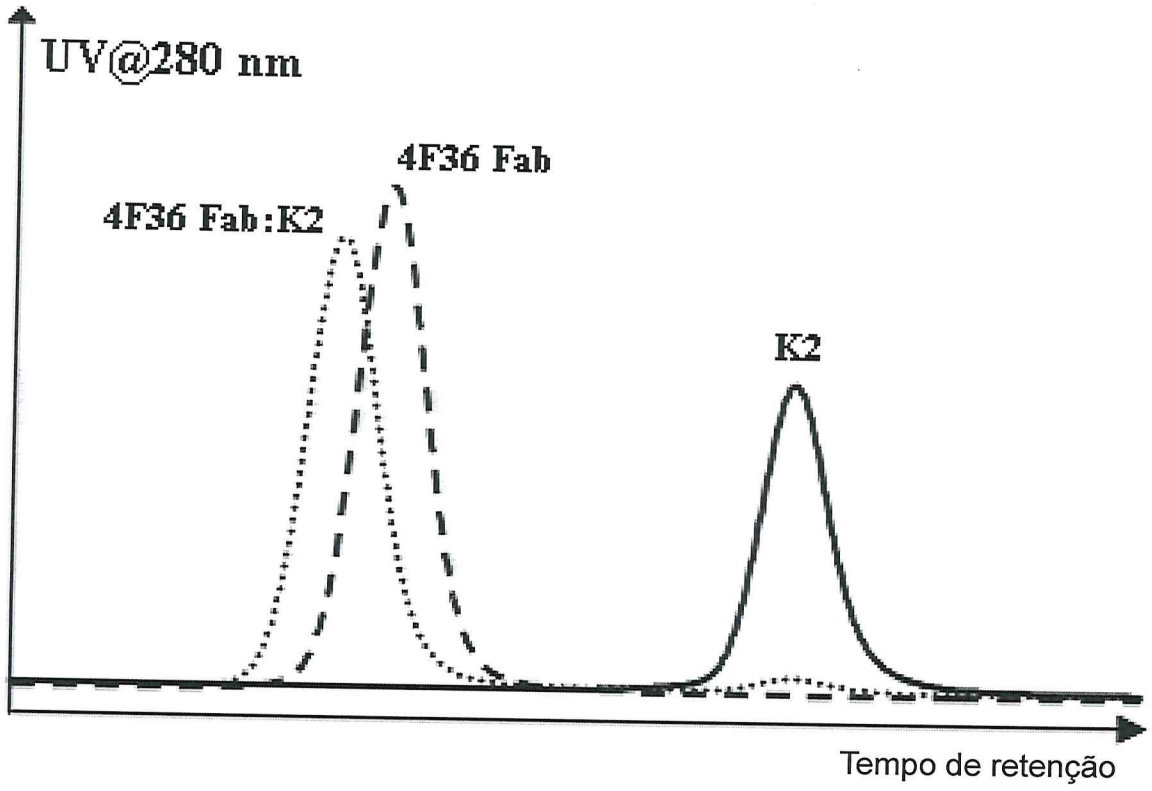


FIG. 7

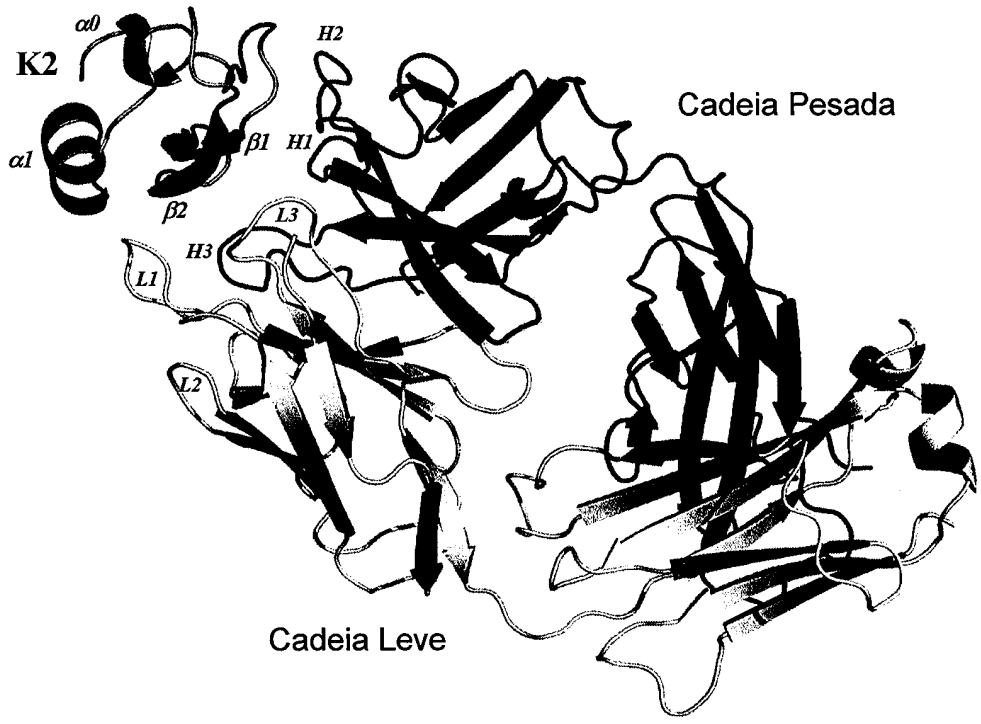


FIG. 8

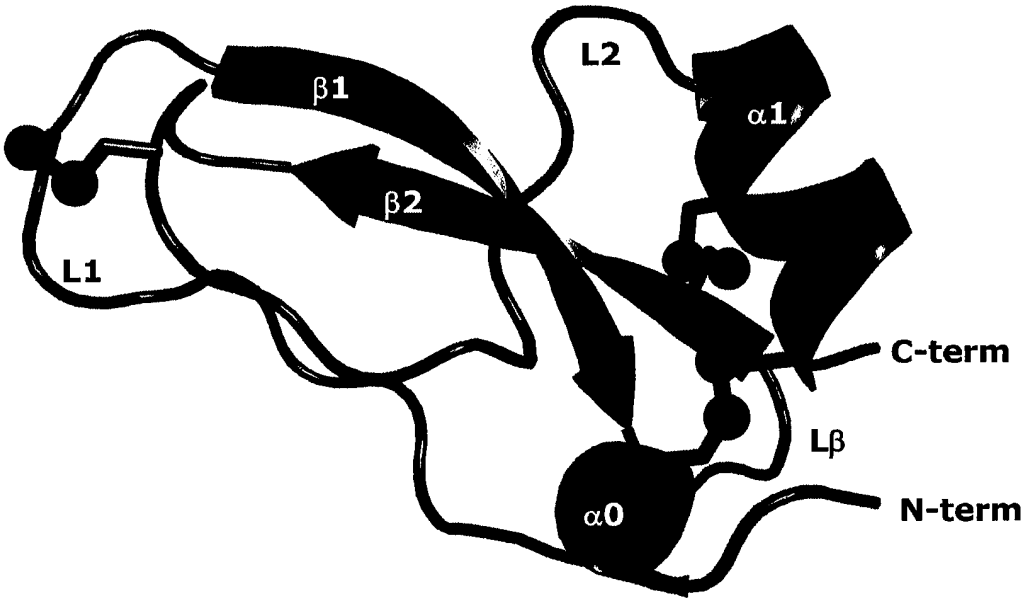
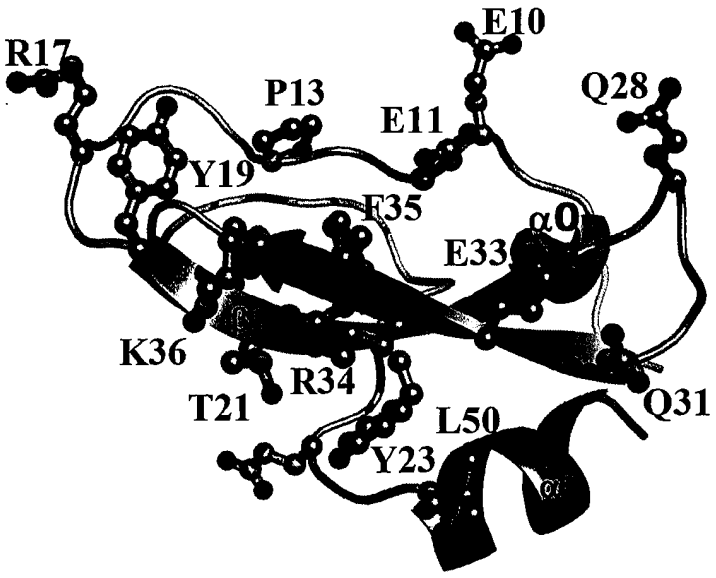


FIG. 9

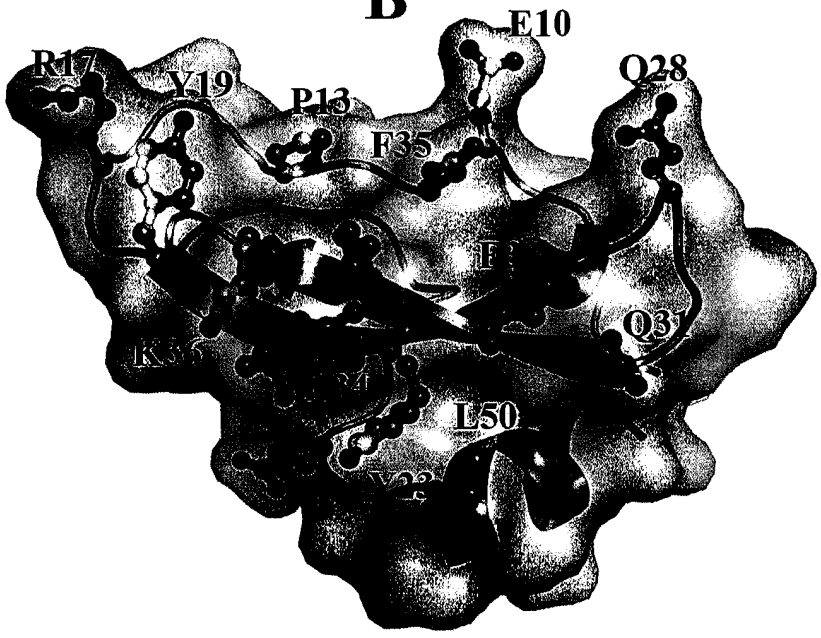


FIG. 10

A



B



C

```
1     QEKPDFCFLE EDPGICRGYI TRYFYNNQTK
           hhhh           s ssssss
31    QCERFKYGGC LGNMNNFETL EECKNICEDG HHHHHHH
      sssssss             h hhhhhh
```

FIG. 11

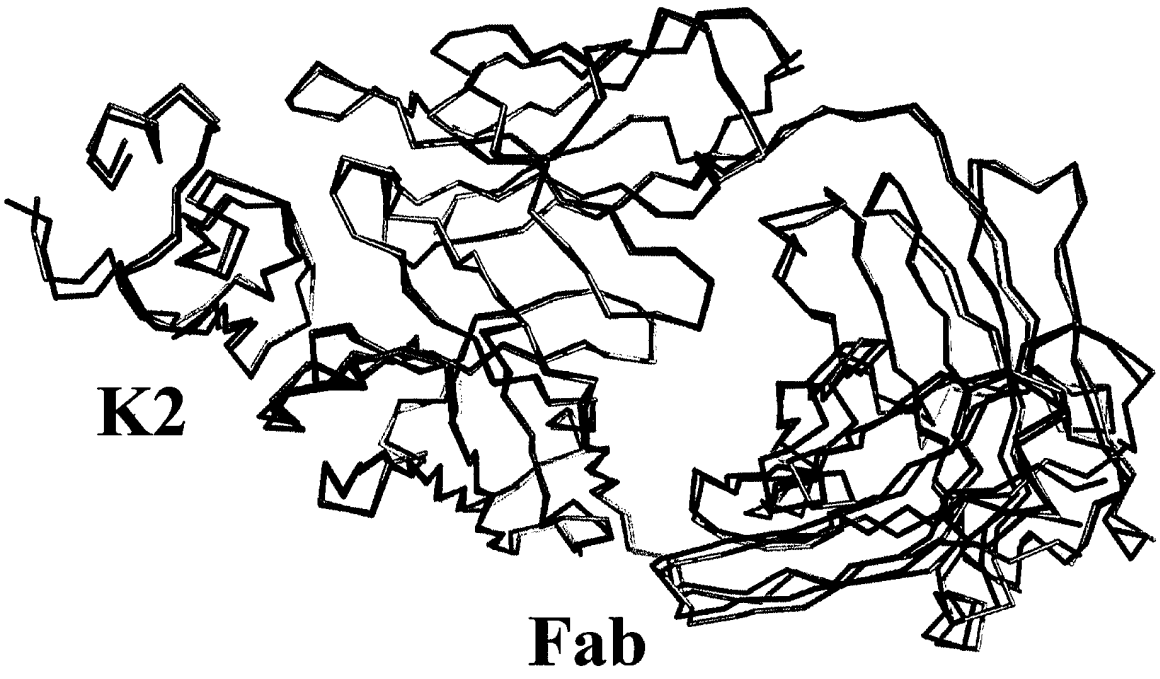


FIG. 12

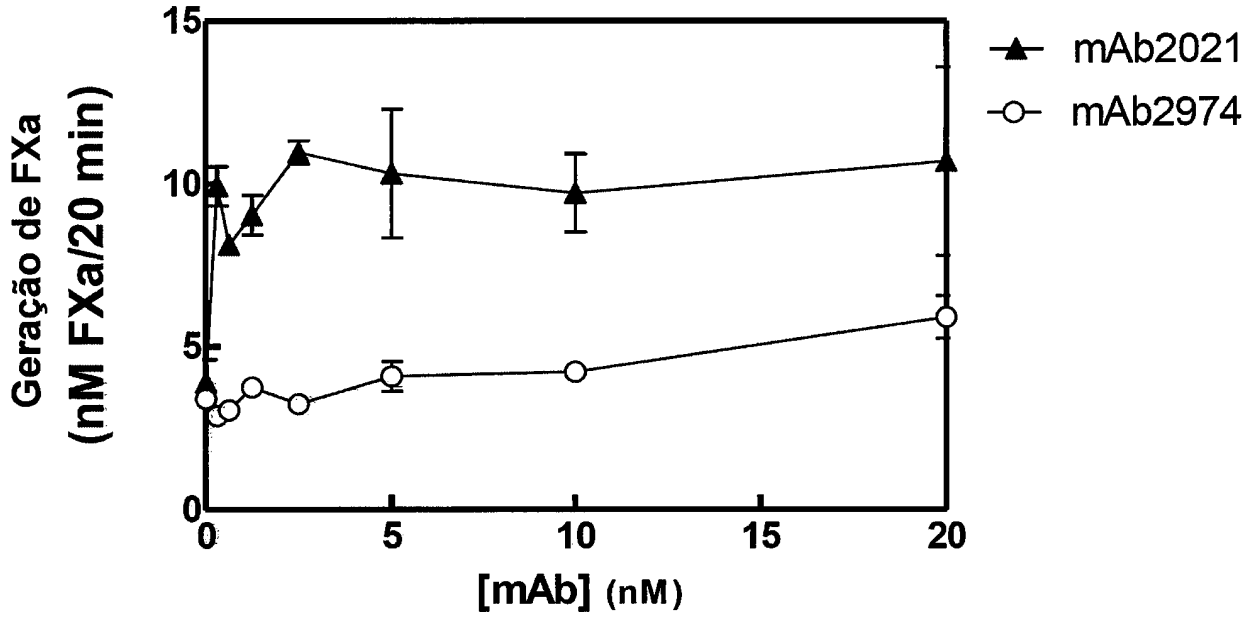

Geração de FXa
(nM FXa/20 min)
15
10
5
0
0
5
10
15
20
[mAb] (nM)
mAb2021
mAb2974

FIG. 13

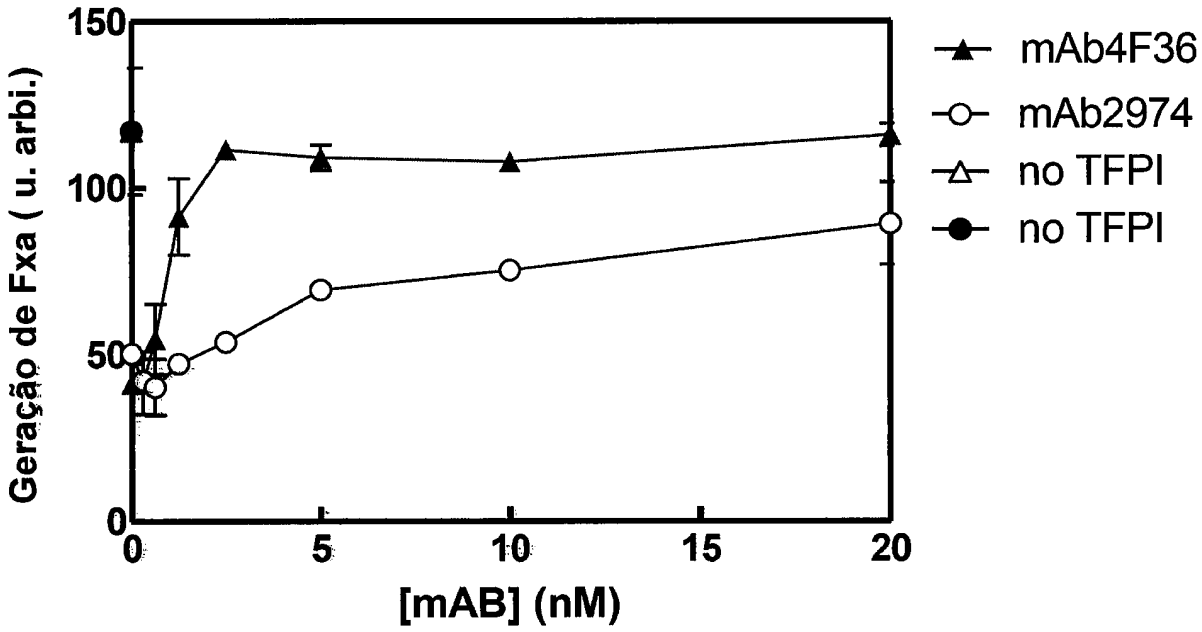

150
100
50
0
0
5
10
15
20
Geração de Fxa (u. arbi.)
[mAB] (nM)
mAb4F36
mAb2974
no TFPI
no TFPI

FIG. 14

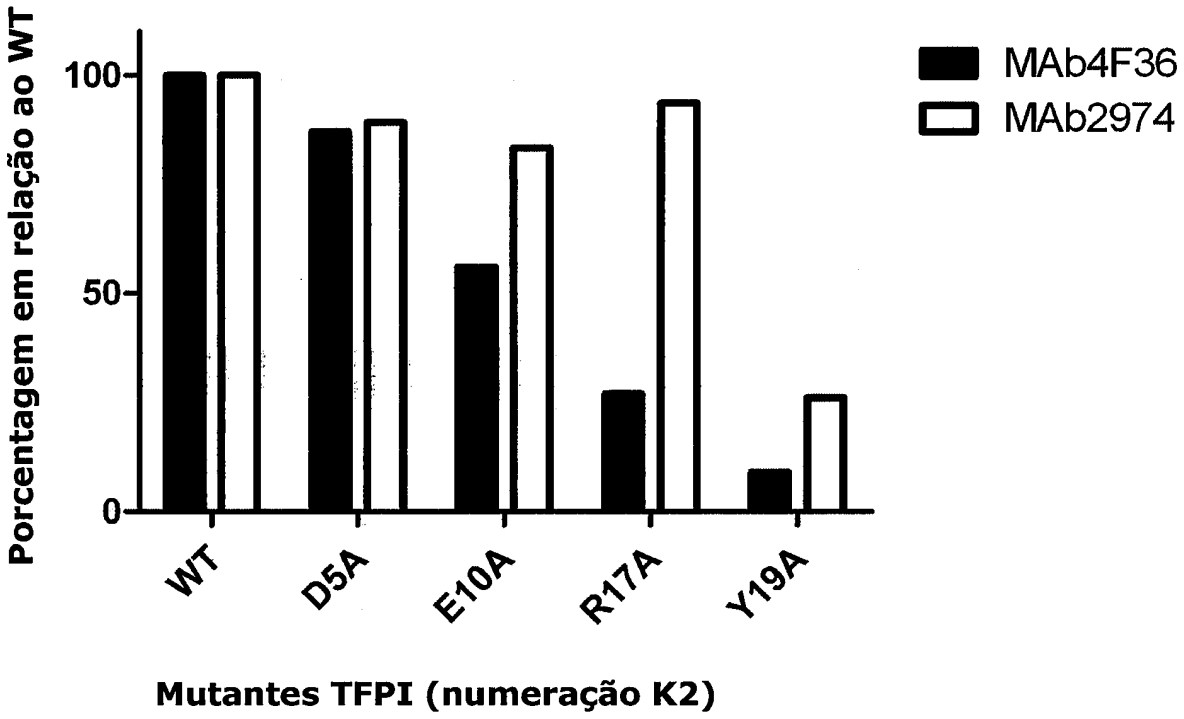
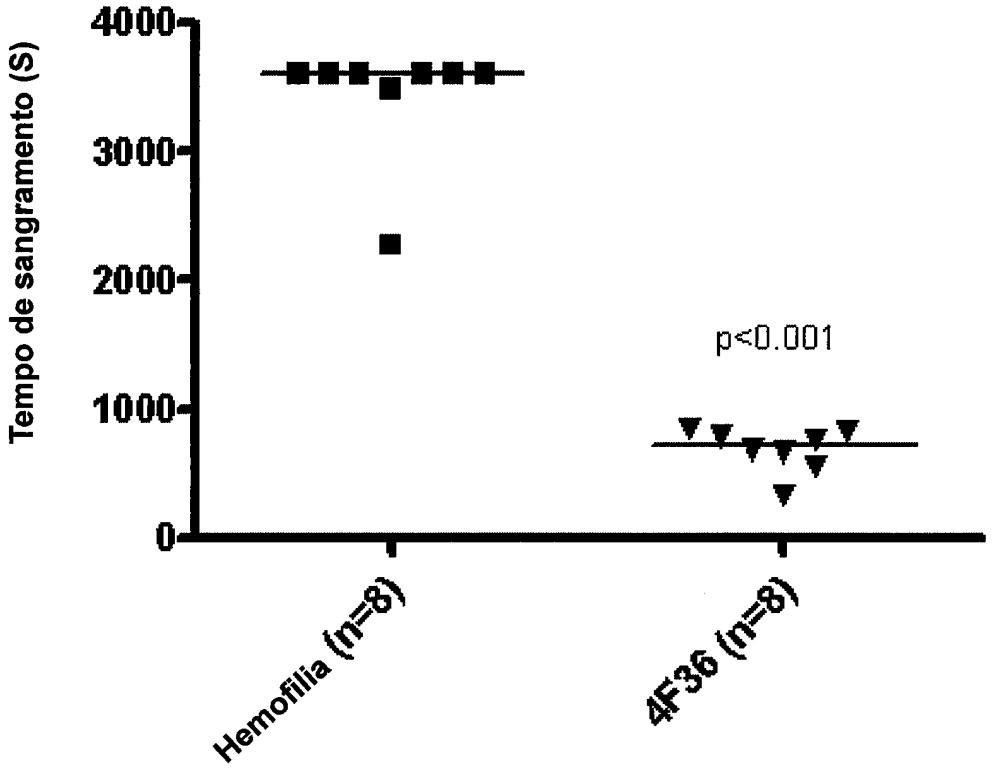

Porcentagem em relação ao WT
100
50
0
WT
D5A
E10A
R17A
Y19A
Mutantes TFPI (numeração K2)
MAb4F36
MAb2974

FIG. 15


Tempo de sangramento (S)
4000
3000
2000
1000
0
p<0.001
Hemofilia (n=8)
4F36 (n=8)

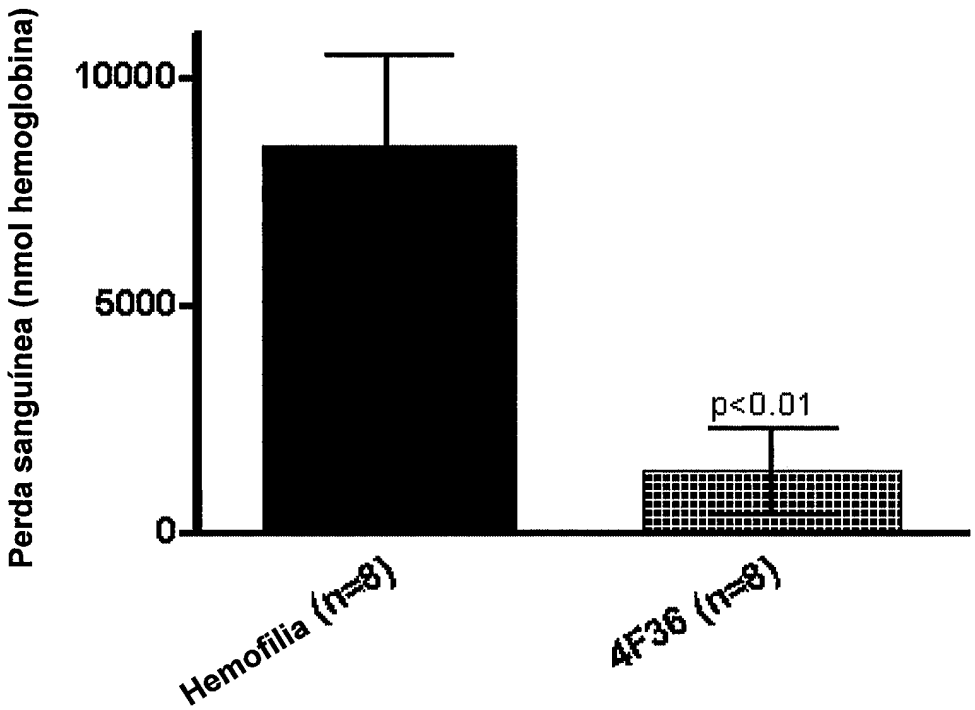

Perda sanguínea (nmol hemoglobina)
10000
5000
0
p<0.01
Hemofilia (n=8)
4F36 (n=8)

FIG. 16

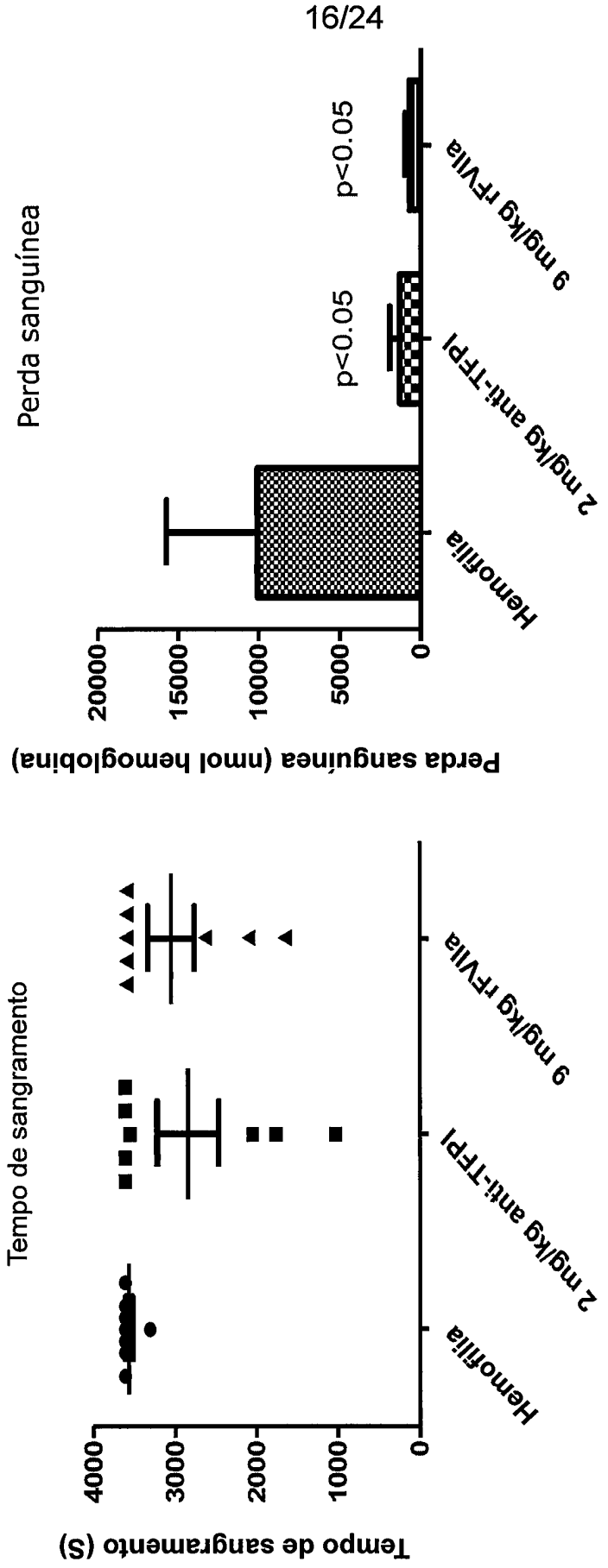

Perda sanguínea
p<0.05
p<0.05
Hemofilia
2 mg/kg anti-TFPI
9 mg/kg rFVIIa
20000
15000
10000
5000
0
Perda sanguínea (nmol hemoglobina)
Tempo de sangramento
Hemofilia
2 mg/kg anti-TFPI
9 mg/kg rFVIIa
4000
3000
2000
1000
0
Tempo de sangramento (S)

FIG. 17

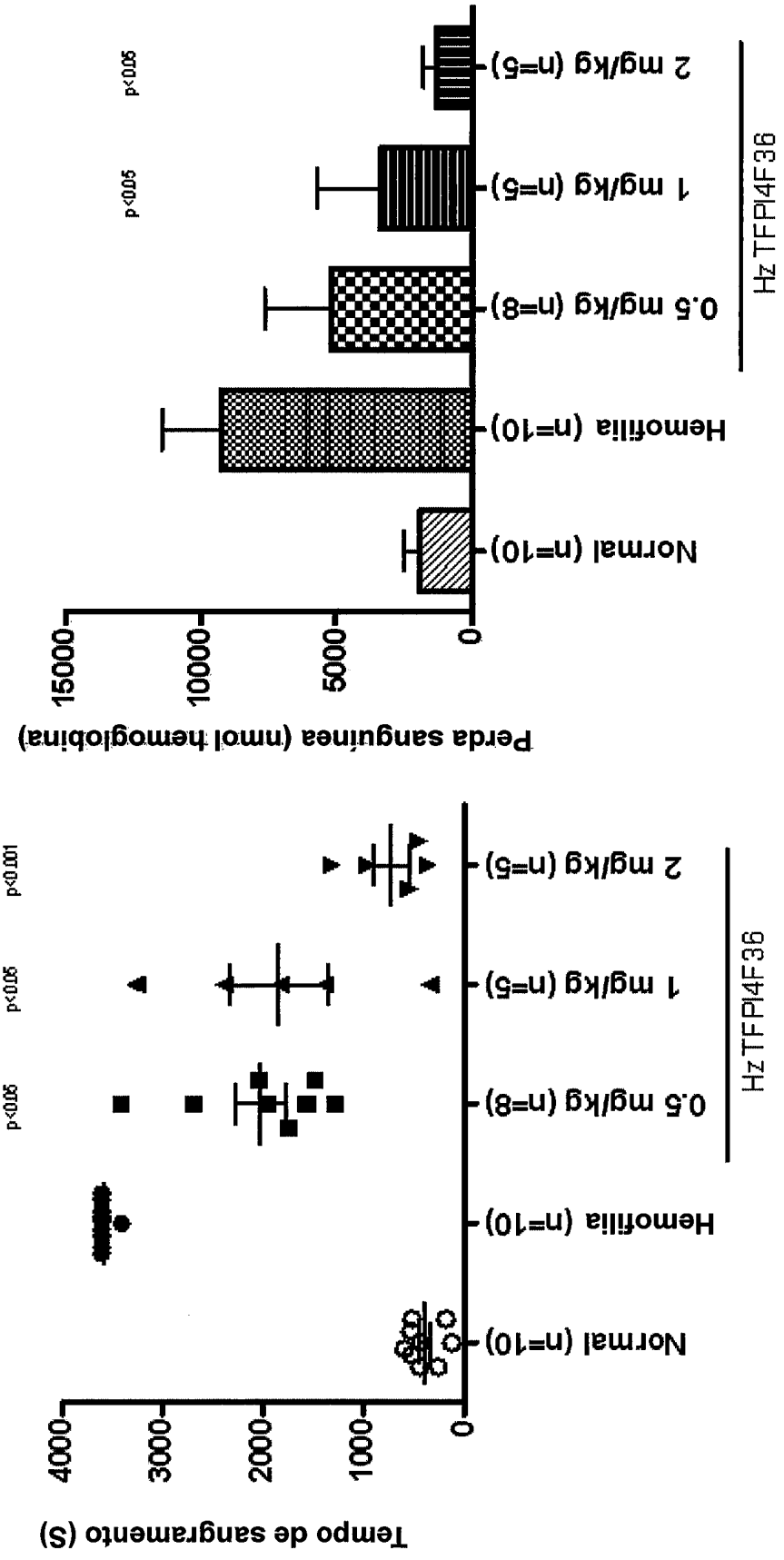

Perda sanguínea (nmol hemoglobina)
15000
10000
5000
0
Normal (n=10)
Hemofilia (n=10)
0.5 mg/kg (n=8)
1 mg/kg (n=5)
2 mg/kg (n=5)
Hz TFPI4F36
p<0.05
p<0.05
p<0.05
Tempo de sangramento (S)
4000
3000
2000
1000
0
Normal (n=10)
Hemofilia (n=10)
0.5 mg/kg (n=8)
1 mg/kg (n=5)
2 mg/kg (n=5)
Hz TFPI4F36
p<0.05
p<0.05
p<0.001

FIG. 18

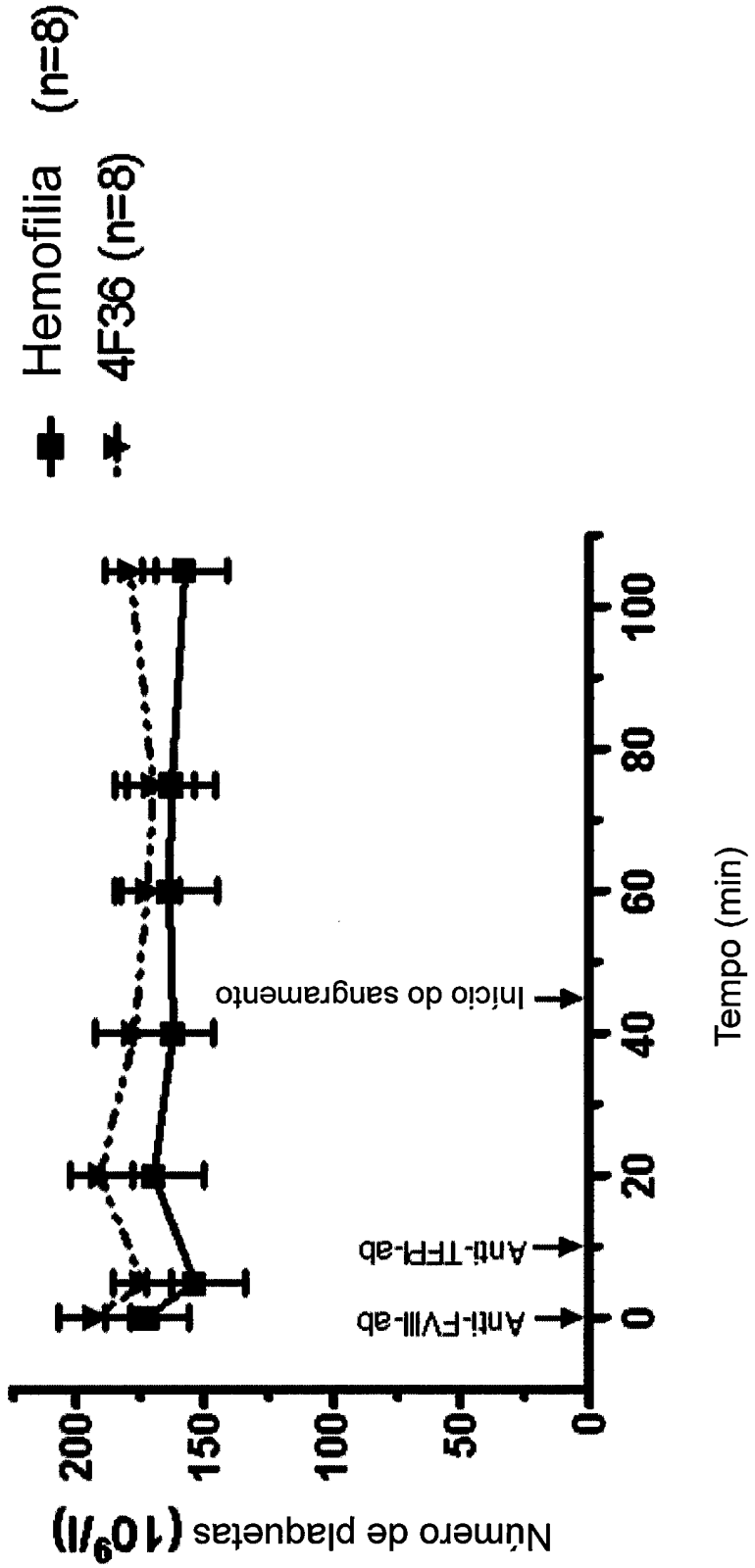
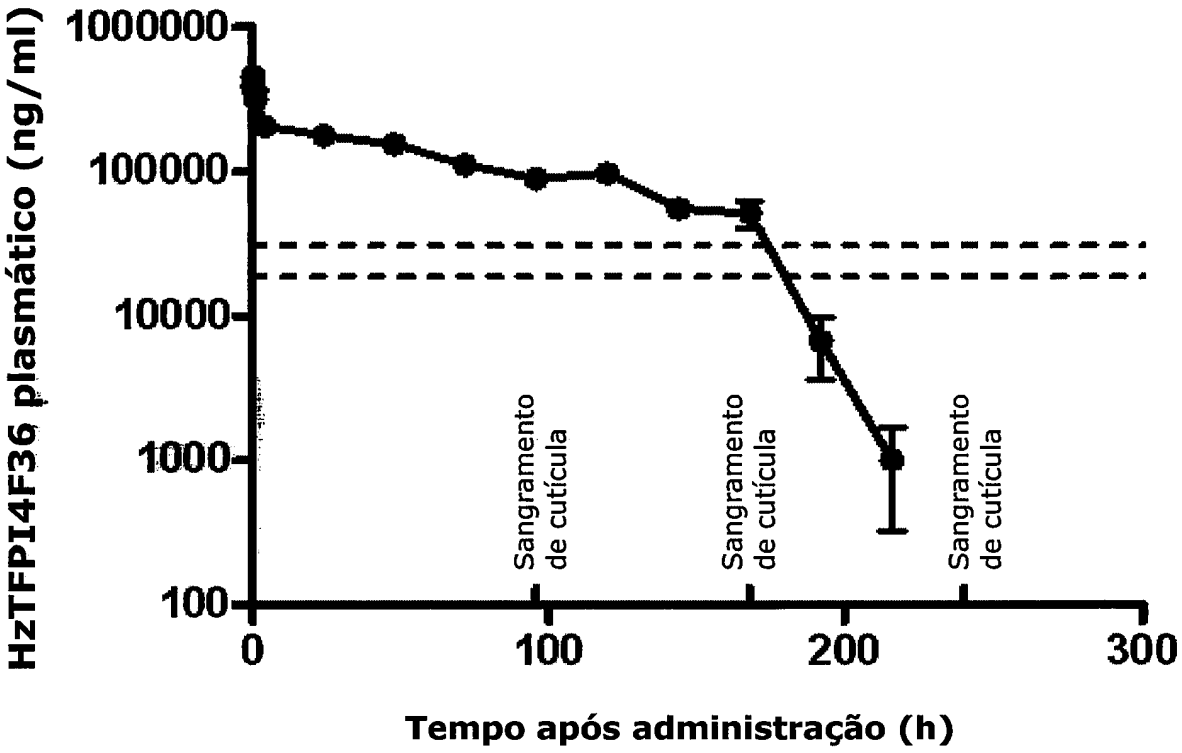

Hemofilia (n=8)
4F36 (n=8)
Número de plaquetas (10^9/l)
200
150
100
50
0
Anti-FVIII-ab
Anti-TFPI-ab
Início do sangramento
0
20
40
60
80
100
Tempo (min)

FIG. 19


HzTFPI4F36 plasmático (ng/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
0
100
200
300
Tempo após administração (h)
Sangramento de cutícula
Sangramento de cutícula
Sangramento de cutícula

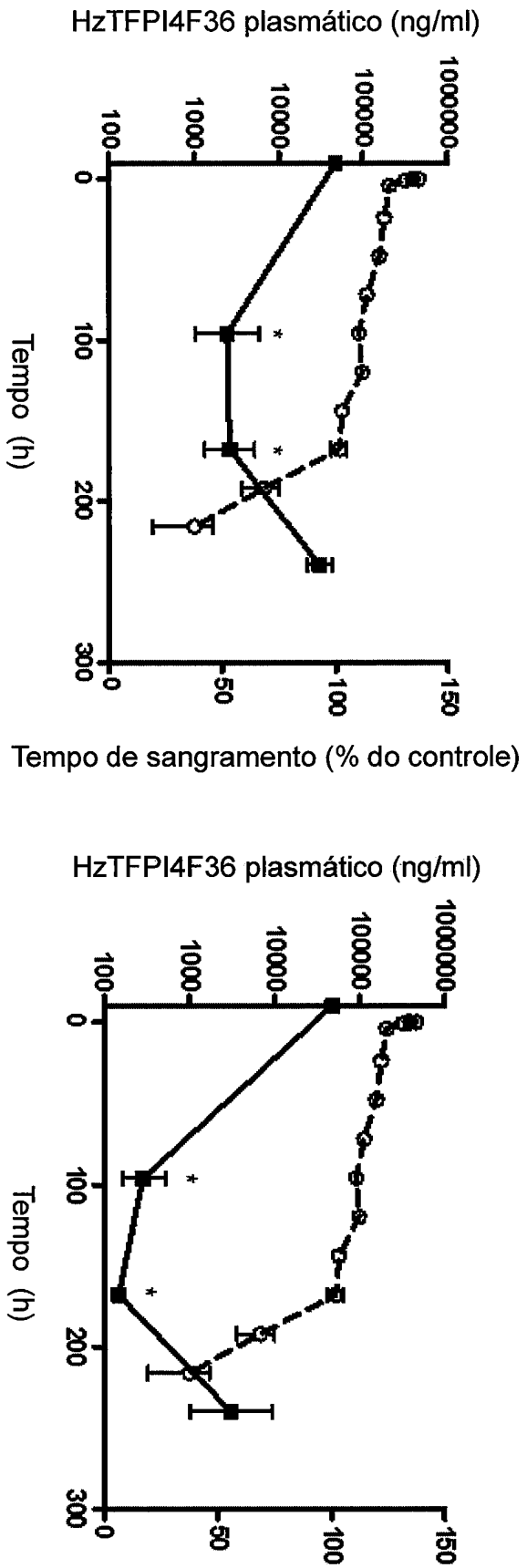

HzTFPI4F36 plasmático (ng/ml)
100
1000
10000
100000
1000000
Tempo (h)
0
100
200
300
*
*
0
50
100
150
Tempo de sangramento (% do controle)
HzTFPI4F36 plasmático (ng/ml)
100
1000
10000
100000
1000000
Tempo (h)
0
100
200
300
*
*
0
50
100
150
Tempo de sangramento (% do controle)

FIG. 20

FIG. 21

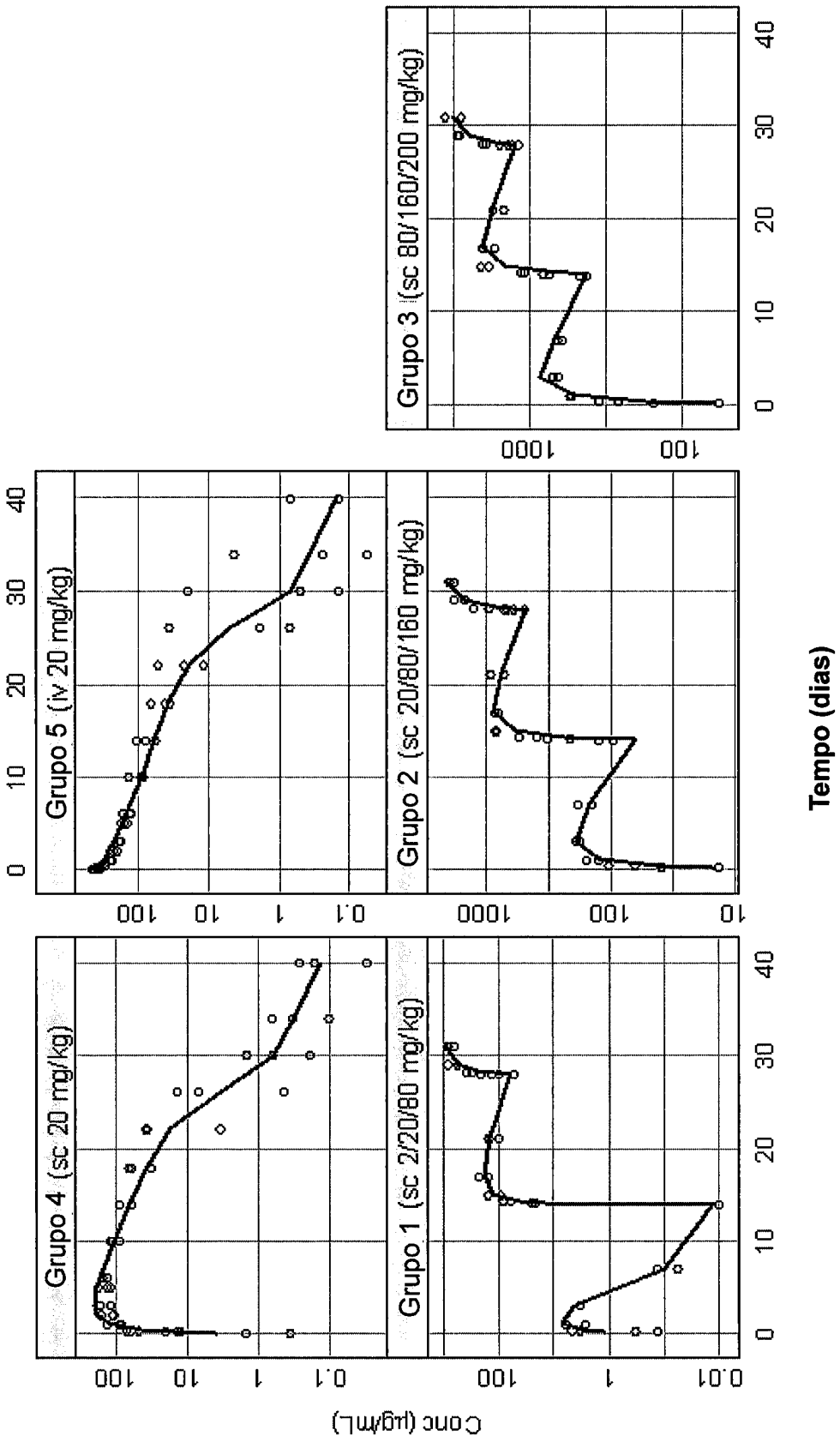

Grupo 4 (sc 20 mg/kg)
Grupo 1 (sc 2/20/80 mg/kg)
Grupo 5 (iv 20 mg/kg)
Grupo 2 (sc 20/80/160 mg/kg)
Grupo 3 (sc 80/160/200 mg/kg)
Conc (µg/mL)
Tempo (dias)

FIG. 22

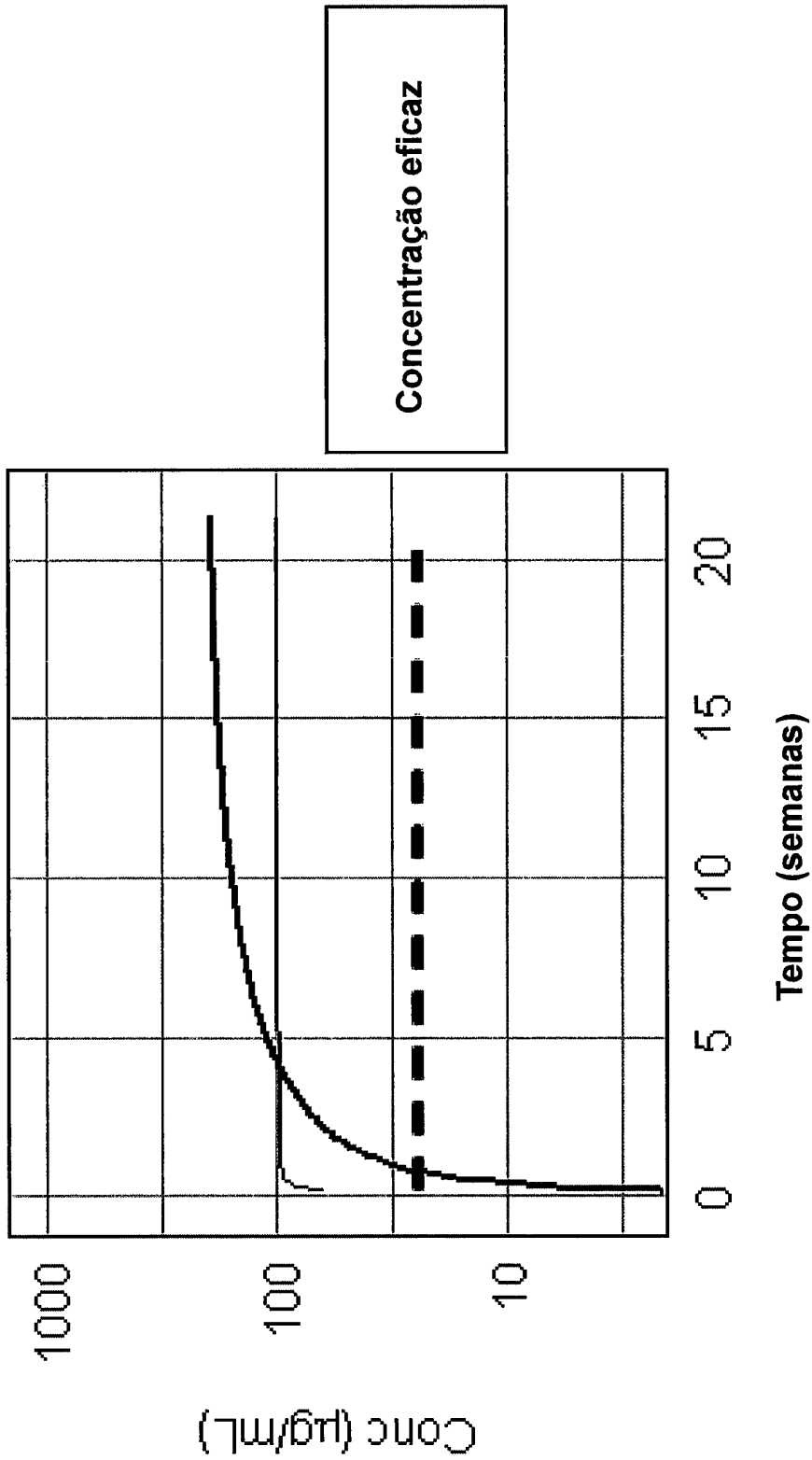

Concentração eficaz
Conc (µg/mL)
1000
100
10
0
5
10
15
20
Tempo (semanas)

FIG. 23

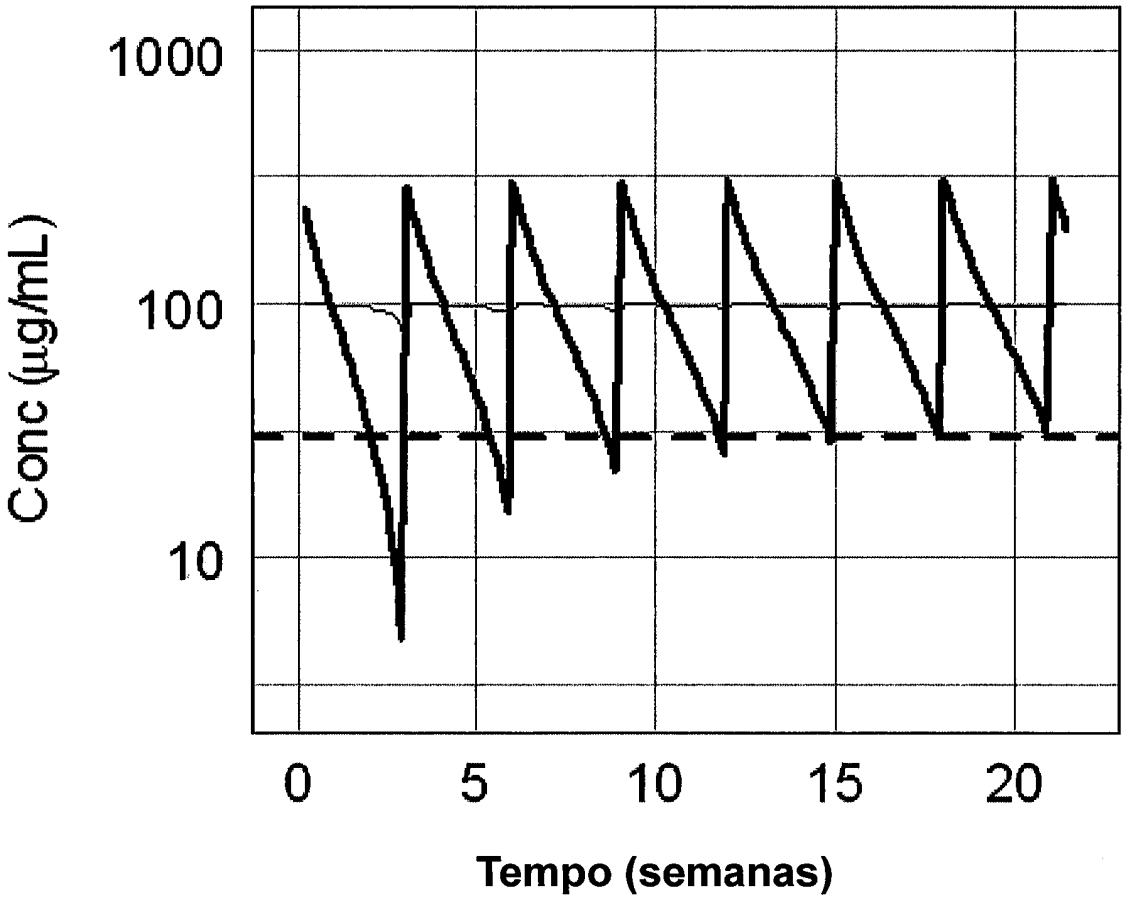
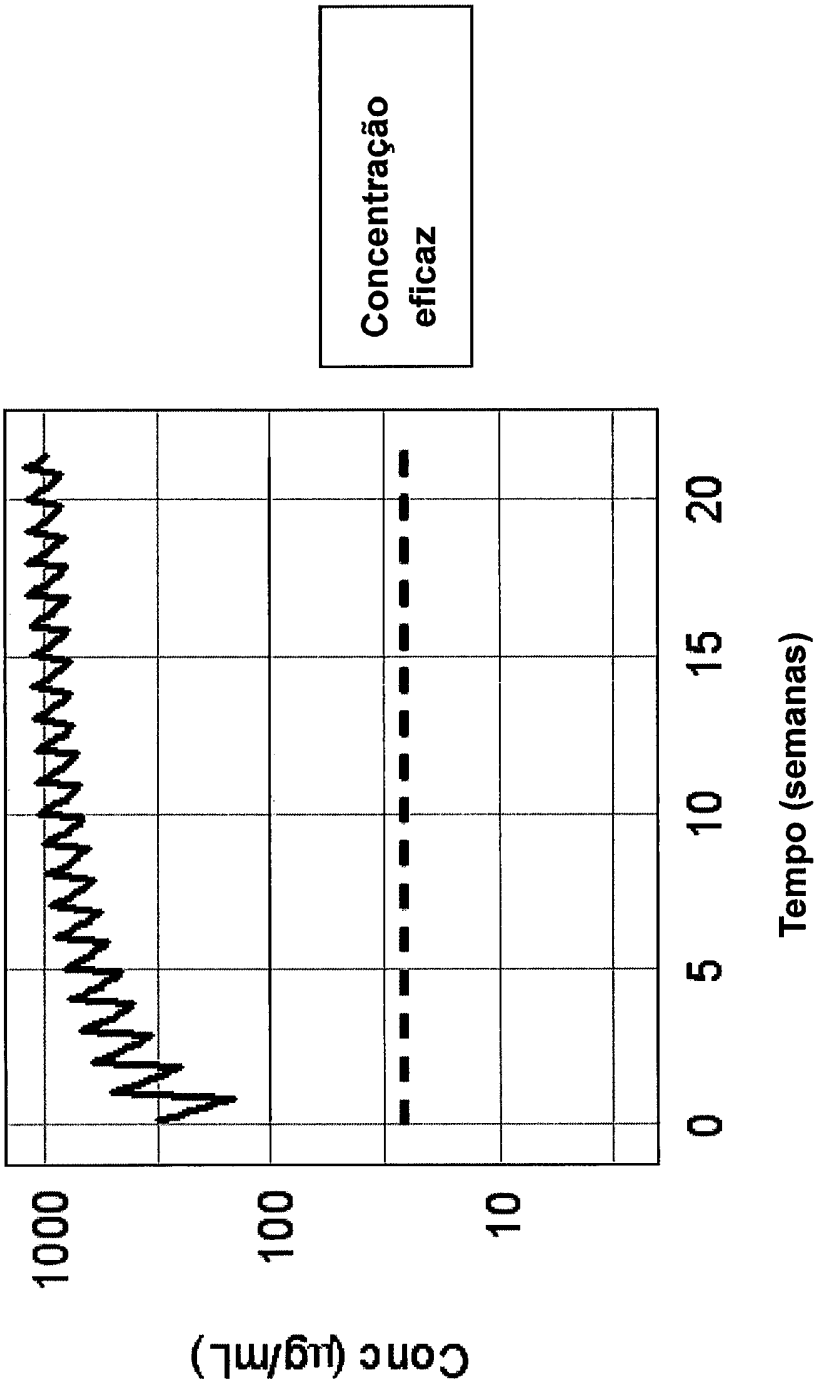


FIG. 24


Concentração eficaz
Conc (µg/mL)
1000
100
10
0
5
10
15
20
Tempo (semanas)