

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 507**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/38**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2014** **PCT/US2014/050896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015** **WO15023752**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2014** **E 14761451 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 3033359**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra el inhibidor de los activadores del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**13.08.2013 US 201361865451 P**  
**22.05.2014 EP 14305757**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.07.2020**

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)**  
**54, rue La Boétie**  
**75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**PRITSKER, ALLA;**  
**GRAILHE, PATRICK;**  
**RAK, ALEXEY;**  
**MATHIEU, MAGALI;**  
**MORGAN, CHRISTOPHER RYAN;**  
**BAURIN, NICOLAS;**  
**POIRIER, BRUNO;**  
**DAVEU, CYRIL;**  
**DUFFIEUX, FRANCIS;**  
**LI, HAN;**  
**KOMINOS, DOROTHEA y**  
**JANIAK, PHILIP**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 770 507 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos dirigidos contra el inhibidor de los activadores del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) y usos de los mismos

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional U.S. nº 61/865.451, presentada el 13 de agosto de 2013, y la Solicitud de Patente Europea nº 14305757.8, presentada el 22 de mayo de 2014.

## ANTECEDENTES

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

El gen SERPINE1 humano (PAI-1) se localiza en el cromosoma 7, consta de ocho intrones y nueve exones, y tiene un tamaño de 12.169 b (Klinger, K.W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8548, 1987). PAI-1 es una glicoproteína de cadena única de aproximadamente 50 kDa (379 aminoácidos) de la superfamilia SERPIN (inhibidor de la serina proteasa) que se sintetiza en la conformación activa pero se vuelve latente espontáneamente en ausencia de vitronectina (Vn). La vitronectina, el cofactor principal de PAI-1, estabiliza la conformación activa con el Bucle del Centro Reactivo (RCL), que es aproximadamente 20 aminoácidos que están expuestos en la superficie. El mecanismo de inhibición de las dos dianas principales de PAI-1 (tPA y uPA) es una inhibición suicida. La región RCL de PAI-1 posee el enlace peptídico cebo (R346-M347, también llamado P1-P'1), que posee el sitio de escisión para esta serina proteasa. Primero se forma un complejo de Michaelis con tPA o uPA, entonces la tríada catalítica reacciona con el enlace peptídico cebo para formar un complejo acil-enzima que, después de la escisión del enlace peptídico P1-P'1, induce fuertes cambios de conformación. Los cambios conformacionales causan la inserción del RCL escindido en una cadena  $\beta$  permaneciendo la proteasa unida covalentemente como una acil enzima con PAI-1. En circunstancias no fisiológicas, la hidrólisis de este complejo acil-enzima puede inducir la liberación del PAI-1 escindido y la proteasa activa libre (Blouse et al., Biochemistry, 48: 1723, 2009).

PAI-1 circula en la sangre a niveles muy variables (intervalo nM) y en exceso con respecto a concentraciones de tPA o uPA. PAI-1 exhibe flexibilidad estructural y se puede encontrar en una de tres conformaciones: (1) una conformación latente, (2) una conformación activa, o (3) una conformación de sustrato (véase la Figura 1). El PAI-1 se encuentra principalmente como un complejo no covalente con vitronectina ( $K_d \sim 1$  nM) que disminuye la transición de latencia en 1,5 a 3 veces. La afinidad de PAI-1 latente, escindida o complejado por la vitronectina se reduce significativamente. La vitronectina unida a la matriz también se localiza con PAI-1 en el espacio pericelular. Las células endoteliales, los monocitos, los macrófagos y las células vasculares del músculo liso sintetizan este PAI-1 que entonces puede almacenarse en grandes cantidades en forma latente mediante plaquetas (en el gránulo  $\alpha$ ). PAI-1 es un inhibidor rápido y específico (con una constante de velocidad de segundo orden de  $10^6$  a  $10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) de tPA y uPA en disolución, pero inactivo contra la proteasa unida a la fibrina o sus receptores celulares. PAI-1 también puede inhibir otras proteasas como la trombina, la plasmina y la proteína C activada, pero de manera menos eficiente.

Se han resuelto varias estructuras 3D del PAI-1 humano desde la primera descrita en 1992 (Mottonen et al., Nature 355:270, 1992) en la conformación latente. Estas estructuras 3D incluyen formas mutantes de PAI-1 en el sustrato (Aertgeerts et al., Proteins 23:118, 1995), conformación activa estabilizada (Sharp et al., Structure 7:111, 1999), PAI complejado el con dominio de somatomedina B de la vitronectina (Zhou et al., Nat. Struct. Biol. 10:541, 2003), o con pentapéptido inhibidor del bucle RCL (Xue et al., Structure 6:627, 1998). Más recientemente, la estructura de PAI-1 de ratón en conformación latente fue elucidada por Dewilde et al. (J Struct. Biol. 171:95, 2010), y revelaron diferencias con el PAI-1 humano en la posición RCL, la región de la puerta y la posición de la  $\alpha$ -hélice A. Las relaciones de estructura/función en PAI-1 se han estudiado usando más de 600 proteínas mutantes (revisado por De Taeye et al., Thromb. Haemost. 92:898, 2004) para localizar dominios involucrados en las diversas actividades de esta serpina multifuncional.

Dado que PAI-1 puede sintetizarse en casi todos los tipos de células, incluyendo hepatocitos, adipocitos, células mesangiales, fibroblastos, miofibroblastos y células epiteliales, su expresión varía mucho en condiciones fisiológicas (por ejemplo, variación circadiana del nivel plasmático de PAI-1) y patológicas (por ejemplo, obesidad, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, infección, enfermedades inflamatorias, cáncer). PAI-1 se considera una

proteína de fase aguda. La regulación transcripcional de la expresión del ARNm de PAI-1 es inducida por varias citocinas y factores de crecimiento (por ejemplo, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , EGF, FGF, insulina, angiotensina II y IV), hormonas (por ejemplo, aldosterona, glucocorticoides, PMA, glucosa alta) y factores de estrés (por ejemplo, hipoxia, especies reactivas de oxígeno, lipopolisacáridos).

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

Se han atribuido varios papeles patogénicos al PAI-1 en enfermedades tromboticas tales como la trombosis arterial y venosa, el infarto agudo de miocardio y la aterosclerosis. Su participación en trastornos metabólicos como el síndrome de resistencia a la insulina y la obesidad es bien reconocida. PAI-1 también se conoce como un factor profibrótico para varios órganos, y se ha demostrado que se sobreexpresa en tejidos fibróticos (es decir, hígado, pulmón, riñón, corazón, adherencias abdominales, piel: cicatriz o esclerodermia) (revisado por Ghosh y Vaughan, J. Cell Physiol. 227:493, 2012). Los ratones sin (knock-out, KO) PAI-1 están protegidos de la fibrosis en diferentes modelos, tal como el hígado (ligadura de conductos biliares o xenobióticos), riñón (modelo de obstrucción ureteral unilateral (UUO)), pulmón (inhalación de bleomicina) (Bauman et al., J. Clin. Invest. 120:1950, 2010; Hattori et al., Am. J. Pathol. 164:1091, 2004; Chuang-Tsai et al., Am. J. Pathol. 163:445, 2003), mientras que en el corazón, esta supresión está protegida de la fibrosis inducida (Takeshita et al., Am. J. Pathol. 164:449, 2004) pero propensa a la fibrosis cardíaca selectiva dependiente de la edad (Moriwaki et al., Cric. Res. 95:637, 2004). Se ha dado a conocer que la regulación descendente de la expresión de PAI-1 por ARNip (Senoo et al., Thorax 65:334, 2010) o la inhibición por compuestos químicos (Izuhara et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28:672, 2008; Huang et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 46:87, 2012) disminuyen la fibrosis pulmonar, mientras que la sobreexpresión de PAI-1 de tipo salvaje (Eitzman et al., J. Clin. Invest. 97:232, 1996) o un mutante de PAI-1 que retiene solo la unión de vitronectina pero no la función inhibidora de tPA exacerba la fibrosis pulmonar (Courey et al., Blood 118:2313, 2011).

La fibrosis hepática de la ligadura del conducto biliar (BDL) se atenúa mediante anticuerpos que neutralizan PAI-1 (patente U.S. nº 7.771.720), mientras que la regulación negativa por ARNip atenúa la fibrosis hepática inducida por BDL y xenobióticos (Hu et al., J. Hepatol. 51:102, 2009). Los ratones PAI-1 KO se protegieron del daño hepático inducido por colesterol y la fibrosis en BDL (Bergheim et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 316:592, 2006; Wang et al., FEBS Lett. 581:3098, 2007; Wang et al., Hepatology 42:1099, 2005) y de la fibrosis hepática inducida por angiotensina II (Beier et al., Arch. Bioch. Biophys. 510:19, 2011).

Los ratones PAI-1 KO están protegidos de la fibrosis renal en el modelo UUO (Oda et al., Kidney Int. 60, 587, 2001), en la nefropatía diabética (Nicholas et al., Kidney Int. 67:1297, 2005) y en nefropatía inducida por angiotensina II (Knier et al., J. Hypertens. 29:1602, 2011; para revisiones, véanse Ma et al. Frontiers Biosci. 14:2028, 2009 y Eddy A.A. Thromb. Haemost. 101:656, 2009). Por el contrario, los ratones que sobreexpresan PAI-1 muestran una fibrosis más severa y un mayor reclutamiento de macrófagos después de UUO (Matsuo et al., Kidney Int. 67: 2221, 2005; Bergheim et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 316:592, 2006). Se ha demostrado que el mutante de PAI-1 no inhibidor (PAI-1 R) protege a los ratones del desarrollo de fibrosis en la glomerulonefritis experimental (thy1) en ratas al disminuir la expresión de proteínas urinarias y la acumulación de matriz glomerular (Huang et al., Kidney Int. 70:515, 2006). Los péptidos que bloquean PAI-1 inhiben la acumulación de colágeno 3, 4 y fibronectina en ratones UUO (Gonzalez et al., Exp. Biol. Med. 234:1511, 2009).

PAI-1, como diana de numerosas patologías, ha sido el foco de una intensa investigación para inhibir su actividad o regular su expresión durante los últimos 20 años. Se han diseñado compuestos químicos (Suzuki et al., Expert Opin. Investig. Drugs 20:255, 2011), anticuerpos monoclonales (Gils y Declerk, Thromb Haemost; 91:425, 2004), péptidos, mutantes (Cale y Lawrence, Curr. Drug Targets 8:971, 2007), ARNip o ARN antisentido para inhibir sus diversas funciones o regular su expresión. Se ha demostrado que varios anticuerpos anti-PAI-1, fragmentos de anticuerpos y métodos para usar tales anticuerpos o fragmentos de anticuerpos son útiles para tratar la fibrosis (documento WO 2011/139973). Sin embargo, a pesar de la intensa investigación, el problema de desarrollar un modulador terapéuticamente eficaz de PAI-1 aún no se ha resuelto. En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de nuevos agentes que inhiban la actividad de PAI-1 para uso en el tratamiento de patologías humanas mediadas por PAI-1.

#### SUMARIO DE LA DESCRIPCIÓN

La invención es como se define por las reivindicaciones.

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al inhibidor de los activadores del plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada CDR1 (SEQ ID NO: 34), CDR2 (SEQ ID NO: 33) y CDR3 (SEQ ID NO: 32) de SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO: 36) y CDR3 (SEQ ID NO: 35) de SEQ ID NO: 7. En un aspecto adicional, la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 6, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 7. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada es 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idéntica a la SEQ ID NO: 6, y la región variable de cadena ligera es 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idéntica a la SEQ ID NO: 7. Todas las aproximaciones de % de identidad indican el % de identidad mínimo; mayores % de identidad que los valores recitados también están abarcados por la descripción.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones estructurales de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 32; y (b) regiones estructurales de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 36, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones estructurales de cadena pesada que son 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idénticas a las regiones estructurales de cadena pesada de SEQ ID NO: 6, y la cadena ligera del anticuerpo comprende regiones estructurales de cadena ligera que son 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idénticas a las regiones estructurales de SEQ ID NO: 7.

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

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

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

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

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al inhibidor de los activadores del plasminógeno humano tipo 1 (PAI-1), en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada CDR1 (SEQ ID NO: 40), CDR2 (SEQ ID NO: 39) y CDR3 (SEQ ID NO: 38) de SEQ ID NO: 8, y una región variable de cadena ligera, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera CDR1 (SEQ ID NO: 43), CDR2 (SEQ ID NO: 42) y CDR3 (SEQ ID NO: 41) de SEQ ID NO: 9. En un aspecto adicional, la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada es 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idéntica a la SEQ ID NO: 8, y la región variable de cadena ligera es 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idéntica a la SEQ ID NO: 9.

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

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

En un aspecto adicional, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones estructurales de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 51, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 50; y (b) regiones estructurales de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 55, una región CDR2 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 54, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 53. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones estructurales de cadena pesada que son 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idénticas a las regiones estructurales de cadena pesada de SEQ ID NO: 10, y la cadena ligera del anticuerpo comprende regiones estructurales de cadena ligera que son 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idénticas a las regiones estructurales de SEQ ID NO: 11.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones estructurales de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 46, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 45, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 44; y (b) regiones estructurales de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 48, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 47. En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo comprende regiones estructurales de cadena pesada que son 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idénticas a las regiones estructurales de cadena pesada de SEQ ID NO: 80, y la

cadena ligera del anticuerpo comprende regiones estructurales de cadena ligera que son 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idénticas a las regiones estructurales de SEQ ID NO: 81.

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

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

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

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

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones estructurales de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 147, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 32; y (b) regiones estructurales de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35.

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

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, que comprende: (a) regiones estructurales de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 32; y (b) regiones estructurales de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35.

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

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

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente al PAI-1 humano, en el que el anticuerpo comprende: (a) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 82, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (b) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 83, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 92, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (c) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 84, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (d) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (e) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (f) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 94, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (g) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 87, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (h) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 88, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 96, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (i) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 97, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (j) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 90, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 98, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (k) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (l) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; (m) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; o (n) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión a antígeno de la misma. En otro aspecto, la región variable de cadena pesada humanizada es 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idéntica a cualquiera de las regiones variables de cadena pesada humanas descritas previamente, y la región variable de cadena ligera humanizada es 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% o 90% idéntica a cualquiera de las regiones variables de cadena ligera humanas descritas previamente.

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

En otro aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente al PAI-1 humano, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una región

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

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

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

En otro aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que inhibe competitivamente la unión a PAI-1 de cualquiera de los anticuerpos descritos. En una realización, se describe aquí un anticuerpo monoclonal aislado que compite por la unión y/o inhibe competitivamente la unión con cualquiera de los anticuerpos monoclonales aislados descritos aquí. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado compite o inhibe competitivamente la unión a PAI-1 humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado compite o inhibe competitivamente la unión a un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, y/o SEQ ID NO: 158. En otra realización, el anticuerpo monoclonal aislado compite o inhibe competitivamente la unión a un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, y/o SEQ ID NO: 161. En una realización, el anticuerpo aislado compite por unirse a un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 156, 157, y/o 158 con un anticuerpo monoclonal aislado que comprende (a) regiones estructurales de cadena pesada, una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 32; y (b) regiones estructurales de cadena ligera, una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35.

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

En un aspecto, se describe en el presente documento un método para tratar una afección causada por una mayor expresión de PAI-1 o una mayor sensibilidad a PAI-1, que comprende administrar a un paciente u otro sujeto, por vía oralmente, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación, o tópicamente, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1.

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

enfermedad pulmonar crónica. En otros aspectos, la generación de plasmina facilita el tratamiento terapéutico de la fibrosis hepática, fibrosis renal, incluyendo enfermedad renal crónica, trombosis, trombosis venosa y arterial, trombosis de venas profunda, isquemia de miembros periféricos, trombosis de coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis, o restenosis de endoprótesis vascular.

5

En otro aspecto, se describe en el presente documento el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por una mayor expresión de PAI-1 o una mayor sensibilidad a PAI-1, que comprende administrar a un paciente u otro sujeto, por vía oral, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación o mediante vía tópica.

- 10 En un aspecto, el medicamento es para tratar una afección que comprende niveles aumentados de tejido fibrótico. En algunos aspectos, la afección se caracteriza por fibrosis. En algunos aspectos, la afección es fibrosis, fibrosis cutánea, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial, y enfermedad pulmonar crónica. En otros aspectos, el medicamento es para tratar una afección que comprende fibrosis hepática, fibrosis renal, incluyendo enfermedad renal crónica, trombosis, trombosis venosa y arterial,
- 15 trombosis de venas profundas, isquemia de miembros periféricos, trombosis de coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis, o restenosis de endoprótesis vascular.

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

- 25 En otro aspecto, se describe en el presente documento el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por una mayor expresión de PAI-1 o una mayor sensibilidad a PAI-1, que comprende administrar a un paciente oralmente, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación, o tópicamente, en el que la afección es fibrosis pulmonar idiopática.

- 30 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para restaurar la generación de plasmina, que comprende administrar a un paciente u otro sujeto del mismo, por vía oral, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación, o tópicamente, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1, en el que la generación de plasmina facilita el tratamiento terapéutico de la fibrosis pulmonar idiopática.

- 35 En otro aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, en el que el anticuerpo restaura la actividad fibrinolítica en un sujeto. En ciertas realizaciones, el anticuerpo restaura la actividad fibrinolítica en un sujeto con accidente cerebrovascular isquémico agudo. El accidente cerebrovascular isquémico agudo puede ser con o sin trombolisis. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado restaura la lisis del coágulo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo restaura la lisis de coágulo in vitro. En todavía otras realizaciones, el anticuerpo restaura la lisis de coágulo in vitro con una IC<sub>50</sub> de
- 40 alrededor de 2 nM.

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

- 50 En otro aspecto, se describe en el presente documento el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar una afección causada por una mayor expresión de PAI-1 o una mayor sensibilidad a PAI-1, que comprende administrar a un paciente por vía oral, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación, o por vía tópica, en el que la afección es un accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis.

- 55 En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para restaurar la generación de plasmina, que comprende administrar a un paciente u otro sujeto que lo necesite, por vía oral, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación, o tópicamente, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1, en el que la generación de plasmina facilita el tratamiento terapéutico del accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombolisis.

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

En otro aspecto, se describe en el presente documento el uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo contra PAI-1 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección causada por una mayor expresión de PAI-1 o una mayor sensibilidad a PAI-1, que comprende administrar a un paciente por vía oral, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación, o por vía tópica, en el que la afección es la formación de adherencias abdominales.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para restaurar la generación de plasmina, que comprende administrar a un paciente u otro sujeto que lo necesite, por vía oral, parenteralmente mediante una disolución inyectable, mediante inhalación, o tópicamente, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo contra PAI-1, en el que la generación de plasmina facilita el tratamiento terapéutico o la prevención de la formación de adherencias. En algunas realizaciones, la formación de adherencias en el sujeto es abdominal.

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

En otro aspecto, el anticuerpo monoclonal aislado descrito aquí es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo Fv monocatenario. En otras realizaciones, la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas por un conector flexible para formar un anticuerpo monocatenario. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo Fab, Fab' o (Fab')<sub>2</sub>.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a PAI-1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo cristalizado. En una realización, se describe en el presente documento un cristal aislado que comprende el fragmento Fab' del anticuerpo monoclonal A44, en el que el fragmento Fab' consiste en la secuencia de cadena ligera SEQ ID NO: 7 y la secuencia de cadena pesada SEQ ID NO: 6. En otra realización, se describe en el presente documento un cristal aislado que comprende un fragmento Fab' que comprende la secuencia de cadena ligera SEQ ID NO: 93 y la secuencia de cadena pesada SEQ ID NO: 86. En una realización, el cristal aislado comprende dimensiones de celda unitaria asimétrica a = 105 Å, b = 152 Å y c = 298 Å. En una realización, el cristal aislado pertenece al grupo espacial P212121. En otra realización, el cristal aislado comprende una resolución de difracción de rayos X de 3,3 Å. En una realización, el cristal aislado retiene la actividad biológica del anticuerpo cristalizado. En algunas realizaciones, el cristal aislado tiene una semivida mayor in vivo que la contraparte soluble del anticuerpo cristalizado.

En un aspecto, se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende: (a) el anticuerpo cristalizado que se une específicamente a PAI-1, y (b) al menos un excipiente farmacéutico que embebe o encapsula el cristal.

En otro aspecto, se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento.

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

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método para seleccionar un anticuerpo contra PAI-1 en un ELISA para determinar su capacidad para bloquear la función de PAI-1 como un inhibidor de la actividad de tPA, que comprende las etapas de: (a) unir PAI-1 a una placa de ELISA; (b) incubar la placa de ELISA con el anticuerpo contra PAI-1; (c) incubar la placa de ELISA con tPA; (d) incubar la placa de ELISA con anticuerpo anti-tPA marcado; y (e) medir la OD<sub>405</sub> emitida por el anticuerpo anti-tPA marcado; en el que una lectura positiva indica que el anticuerpo contra PAI-1 se une a PAI-1 pero no bloquea la formación del enlace covalente entre PAI-1 y tPA, y una lectura negativa indica que el anticuerpo contra PAI-1 bloquea la interacción de tPA con PAI-1.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un método de detección de hibridomas. En ciertas realizaciones, el método de detección comprende un método de detección inversa que usa anticuerpos anti-PAI-1 inmovilizados anti-ratón. En otras realizaciones, el método de detección comprende un ensayo de detección directa usando PAI-1 libre como ligando o contra vitronectina inmovilizada. En ciertas realizaciones, el método se aplica para determinar la afinidad de un anticuerpo por un complejo PAI-1/vitronectina. En algunas realizaciones, el método comprende: inmovilizar vitronectina a una superficie; poner en contacto PAI-1 con la vitronectina inmovilizada a la superficie, formando así un complejo; poner en contacto la superficie que comprende el complejo con el anticuerpo;

separar el anticuerpo unido al complejo del anticuerpo no unido; detectar el anticuerpo unido al complejo, y analizar los niveles de anticuerpo unido al complejo para determinar la afinidad del anticuerpo por el complejo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa una representación esquemática de los mecanismos entre PAI-1 y las serina proteasas activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA) y activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA). PAI-1 exhibe flexibilidad estructural y puede aparecer en una conformación latente o una conformación activa cuando se une a la vitronectina (Vn). La región RCL de PAI-1 posee el enlace peptídico cebo (también llamado P1-P1') que es el sitio de escisión por la serina proteasa. Primero se forma un complejo de Michaelis con tPA o uPA, entonces la tríada catalítica reacciona con el enlace peptídico cebo para formar un complejo acil-enzima que, después de la escisión del enlace peptídico P1-P1', induce fuertes cambios de conformación. La acil enzima es un complejo lábil formado por un enlace covalente entre el resto de serina (triángulo negro) de la tríada catalítica de la serina proteasa (tPA) y el aminoácido del sustrato (círculo negro) que se somete a una hidrólisis adicional. Los cambios conformacionales provocan la inserción del RCL escindido en una cadena  $\beta$ , permaneciendo la proteasa unida covalentemente como una acil enzima con PAI-1. Bajo circunstancias no fisiológicas, la hidrólisis de este complejo acil-enzima puede inducir la liberación del PAI-1 escindido y la proteasa activa libre.

La Figura 2 representa una curva estándar típica para la titulación de anticuerpos en el ELISA de unión como se describe en el Ejemplo 2. Los anticuerpos 31C9, 33B8 y 33H1 fueron controles positivos, y la IgG1 fue un control negativo.

La Figura 3 representa una curva de representación para un ELISA funcional para seleccionar anticuerpos que bloquean la interacción de PAI-1 con tPA como se describe en el Ejemplo 4. El anticuerpo 33H1 es un control positivo, IgG1 es un control negativo, y A44 se identificó como un clon de anticuerpo positivo.

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

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

La Figura 6 representa el PAI-1 humano y sus ortólogos bloquean la actividad del tPA humano en un ensayo cromogénico con una potencia similar.

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

La Figura 8 muestra el análisis de SDS-Page del mecanismo de acción para los anticuerpos 33H8 (convierte PAI-1 de conformación activa a latente), 33H1 (convierte PAI-1 de conformación activa a sustrato) y A44 para bloquear la interacción de PAI-1 con tPA. Línea 1: patrones de peso molecular; Línea 2: solo PAI-1; Línea 3: solo tPA; Línea 4: PAI-1 en presencia de tPA; Línea 5: 33B8 + PAI-1 + tPA; Línea 6: 33H1 + PAI-1 + tPA; Línea 7: A44 + PAI-1 + tPA; Línea 8: mAb es un anticuerpo de control de isotipo.

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

La Figura 10 representa el análisis de SDS-Page del mecanismo de acción para los anticuerpos 33H8 (convierte PAI-1 de conformación activa a latente), 33H1 (convierte PAI-1 de conformación activa a sustrato) y anticuerpos desarrollados a partir de fusiones A39, B109 y C45 para bloquear la interacción de PAI-1 con tPA. Línea 1: patrones de peso molecular; Línea 2: solo PAI-1; Línea 3: solo tPA; Línea 4: PAI-1 en presencia de tPA; Línea 5: 33B8 + PAI-1 + tPA; Línea 6: 33H1 + PAI-1 + tPA; Línea 7: A39 + PAI-1 + tPA; Línea 8: B109 + PAI-1 + tPA; Línea 9: C45 + PAI-1 + tPA; Línea 10: mAb es un anticuerpo de control de isotipo.

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

La Figura 12 representa la alineación de la cadena pesada de los siguientes anticuerpos murinos: A105 (SEQ ID NO: 2), A39 (SEQ ID NO: 4), A44 (SEQ ID NO: 6), A71 (SEQ ID NO: 8), A75 (SEQ ID NO: 80), B109 (SEQ ID NO: 10), B28 (SEQ ID NO: 12), C45 (SEQ ID NO: 14), E16 (SEQ ID NO: 16), y E21 (SEQ ID NO: 18). Las CDR, según lo definido por IMGT, se resaltan en negrita.

La Figura 13 representa la alineación de la cadena ligera de A44 murina (SEQ ID NO: 7) con vk1 (SEQ ID NO: 101) y vlambda3 (SEQ ID NO: 102).

La Figura 14 representa la alineación de la cadena pesada de A44 murina (SEQ ID NO: 6) con vh2 (SEQ ID NO: 103) y vh4 (SEQ ID NO: 104).

5 La Figura 15 representa el clon A44 de humanización VL con todos los constructos alineados. Todas las secuencias alineadas (SEQ ID NOS: 91-98) se describen adicionalmente a continuación en la Tabla 25. Los cuadros negros representan dominios CDR. Los restos resaltados varían en secuencia del resto directamente arriba en la alineación. La numeración de los restos es la descrita por IMGT.

10 La Figura 16 representa el clon A44 de humanización VH con todos los constructos alineados. Todas las secuencias alineadas (SEQ ID NOS: 82-90) se describen adicionalmente a continuación en la Tabla 25. Los cuadros negros representan dominios CDR. Los restos resaltados varían en secuencia del resto directamente arriba en la alineación. La numeración de los restos es la descrita por IMGT.

La Figura 17 representa el porcentaje de inhibición de la actividad de PAI-1 representada gráficamente en función de la concentración de mAb, y se determinó la IC<sub>50</sub> I<sub>max</sub> usando el software de velocidad Biostat.

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

La Figura 19 representa el análisis de SPR con Biacore 2000 usando un análisis cinético único de la unión glicosilada de PAI-1 humano al anticuerpo APG inmovilizado. Un sensograma de cinética de ciclo único se muestra en gris. El modelo de ajuste se muestra en negro.

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

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

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

30 La Figura 23 representa la restauración de la lisis del coágulo de plasma humano por A44V11 o control negativo de isotipo IgG1 humano a diversas concentraciones.

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

La Figura 25 representa la restauración de la lisis del coágulo de plasma humano por las variantes 2 y 4 de APG a diversas concentraciones.

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

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

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

45 La Figura 29 representa el nivel de Dímero D de ratón en BALF de ratones tratados con bleomicina el día 7 y el día 9 después del tratamiento en el día 4 con A44 o IgG1 a 10 mg/kg o PBS mediante administración i.p. según lo determinado por ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago). Se indica un incremento en número de veces en el dímero D inducido por A44 en comparación con IgG.

50 La Figura 30 representa el peso pulmonar derecho de ratones humanizados transgénicos 21 días después del tratamiento con disolución salina o bleomicina seguido de PBS (vehículo), IgG1 o A44 10 mg/kg mediante administración i.p. del día 4 al día 20 cada 3 días.

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

5 La Figura 32 representa el nivel de PAI-1 activo en plasma de monos tratados con mAb A44V11 (A) (n = 5) o con control de isotipo IgG1 (B) (n = 4) (5 mg/kg ip) 24 horas antes de la exposición a LPS (100 ug/kg iv). Se recogieron muestras de sangre en el punto de tiempo indicado, y los niveles de PAI-1 activo se determinaron en plasma usando el ELISA (# HPAIKT de Molecular Innovation).

10 La Figura 33 muestra el nivel de PAI-1 activo en la biopsia hepática de monos tratados con mAb A44V11 (A) (n = 5) o con control de isotipo IgG1 (B) (n = 4) (5 mg/kg ip) 24 horas antes de la exposición a LPS (100 ug/kg iv). Se recogieron biopsias de hígado en monos anestesiados en el punto de tiempo indicado, y los niveles de PAI-activo se determinaron en lisados usando el ELISA (# HPAIKT de Molecular Innovation).

15 La Figura 34 representa el nivel de dímero D en plasma de monos tratados con mAb A44V11 (A) (n = 5) o con control de isotipo IgG1 (B) (n = 4) (5 mg/kg ip) 24 horas antes de la exposición a LPS (100 ug/kg iv). Se recogieron muestras de sangre en el punto de tiempo indicado, y los niveles de dímero D se determinaron en plasma usando el ELISA.

La Figura 35 representa el nivel de complejos de plasmina- $\alpha$ 2 antiplasmina (PAP) en plasma de monos tratados con mAb A44V11 (A) (n = 5) o con control de isotipo IgG1 (B) (n = 4) (5 mg/kg ip) 24 horas antes de la exposición a LPS (100 ug/kg iv). Se recogieron muestras de sangre en el punto de tiempo indicado, y los niveles de PAP se determinaron en plasma usando el ELISA (# Asserachrom PAP de Diagnostica Stago).

20 La Figura 36 representa el nivel de PAI-1 activo en líquido intraperitoneal (IPF) y lisados de cuerno uterino. Niveles de PAI-1 activo en el líquido intraperitoneal (A) y lisados del cuerno uterino (B). En los puntos de tiempo de 6 horas y el día 7, los niveles de PAI-1 activo fueron más bajos tanto en el líquido intraperitoneal (IPF) como en los lisados de cuerno uterino (UH) en los animales tratados con el anticuerpo A44V11 en comparación con los animales tratadas con el anticuerpo de control de isotipo, no hubo diferencia observada a las 72 horas. (\* p <0,001 calculado por la prueba de la T de Student).

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

La Figura 38 representa la purificación de Fab A44 etiquetado con 6-His recombinante de homogeneidad complejo con la proteína PAI-1 de tipo salvaje humana.

30 La Figura 39(a) representa la cristalización compleja del complejo Fab A44/PAI-1, y la Figura 39(b) representa los mejores cristales optimizados.

La Figura 40 representa los monocristales en forma de barilla del complejo Fab A44/PAI-1.

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

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

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

La Figura 44 representa el paratopo de cadena ligera del complejo Fab A44/PAI-1.

40 La Figura 45 representa una alineación de secuencias de los epítipos de unión a A44 propuestos de PAI-1 de cyno, humano, rata y ratón. Las secuencias se extraen de SEQ ID NO: 1 (PAI-1 humano), SEQ ID NO: 162 (PAI-1 cyno), SEQ ID NO: 163 (PAI-1 ratón), y SEQ ID NO: 164 (PAI-1 rata).

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

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

La Figura 48 representa la cobertura peptídica de cyno-PAI-1 (SEQ ID NO: 162); se obtiene una cobertura de secuencia del 95,3% a partir de 150 péptidos peptídicos que solapan.

50 La Figura 49 representa gráficas representativas de absorción de deuterio para péptidos cyno-PAI-1 en los estados no unidos (líneas circulares), unidos a APGv2 (líneas x) y unidos a A44v11 (líneas de diamante). Los intervalos/posiciones de restos son de SEQ ID NO: 162. (A) la mayoría de los péptidos peptídicos no mostraron diferencias entre cyno-PAI-1 solo o unido a ninguno de los mAb. (B), los péptidos que cubren los restos 44-64

mostraron una protección similar contra el intercambio en ambos estados unidos a mAb. (C), los péptidos que incorporan los restos 295-322 incorporan menos deuterio en ambos estados unidos a mAb; sin embargo, la magnitud de la protección es mayor para A44v11.

5 La Figura 50 representa la comparación de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX) de cyno-PAI-1 solo y unido a A44v11. (A), gráfica de mariposa del intercambio fraccional relativo promedio con el estado no unido arriba y el estado unido abajo. Las líneas corresponden a los datos adquiridos para los puntos de tiempo de 10 segundos, 1 minuto, 5 minutos y 240 minutos. En (B), gráfica de los datos de diferencia (en daltons) de la gráfica anterior en (A) para cyno-PAI-1 solo o unido a A44v11.

10 La Figura 51 representa la comparación de HDX de cyno-PAI-1 solo y unido a APGv2. En (A), gráfica de mariposa del intercambio fraccional relativo promedio con el estado no unido arriba y el estado unido abajo. Las líneas corresponden a los datos adquiridos para los puntos de tiempo de 10 segundos, 1 minuto, 5 minutos y 240 minutos. En (B), gráfica de los datos de diferencia del panel (A) anterior para cyno-PAI-1 solo o unido a APGv2.

15 La Figura 52 representa la comparación de HDX de cyno-PAI-1 unido a A44v11 y unido a APGv2. En (A), gráfica de mariposa del intercambio fraccional relativo promedio con el estado unido a APGv2 arriba y el estado unido a A44v11 abajo. Las líneas corresponden a los datos adquiridos para los puntos de tiempo de 10 segundos, 1 minuto, 5 minutos y 240 minutos. En (B), gráfica de los datos de diferencia del panel (A) anterior para cyno-PAI-1 unido a APGv2 o A44v11.

20 La Figura 53 representa el epítipo de cyno-PAI-1:A44v11 determinado por HDX MS. Los restos de cynoPAI-1 (SEQ ID NO: 162) que muestran protección contra el intercambio en el estado unido al anticuerpo A44v11 se muestran en negrita. Los restos del epítipo de cyno-PAI-1:A44v11 determinado a partir de los estudios de cristalización se muestran en recuadros.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen específicamente a PAI-1 humano y modulan las funciones biológicas de PAI-1. Dichos anticuerpos son particularmente útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados a PAI-1 (por ejemplo, fibrosis). La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas, así como ácidos nucleicos que codifican anticuerpos contra PAI-1, vectores de expresión recombinantes y células hospedantes para producir tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos. Los métodos para usar anticuerpos también se describen en el presente documento para detectar PAI-1 o para modular la actividad de PAI-1, *in vitro* o *in vivo*.

#### 30 I. Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "PAI-1 humano" se refiere a un péptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos enumerada a continuación:

VHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQAQASKDRNVFSPYGVASVLAMLQLTTG  
GETQQQIQAAAMGFKIDDKGMALRHLKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRD  
LKLVLQGFMPHFRLFRSTVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISNLLGK  
GAVDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMAQT  
NKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEVPLSALTNILSAQLI  
SHWKGNMTRLRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSD  
QEPLHVAQALQKVKEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIIMDRPFLFVVRH  
NPTGTVLFMGQVMEP (SEQ ID NO. 1),

35 o un fragmento de la misma.

40 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviado  $V_H$  o VH) y una región constante de cadena pesada ( $C_H$  o CH). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada  $V_L$  o VL) y una región constante de cadena ligera ( $C_L$  o CL). La región constante de cadena ligera comprende un dominio ( $C_{L1}$ ). Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta de tres CDRs

y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Como se usa en el presente documento, la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluye cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético, o genéticamente modificado, que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y opcionalmente los constantes del anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de porciones de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv monocatenario (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de la complementariedad aislada (CDR)). Otras moléculas modificadas, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, también están incluidas dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno”.

Como se usa en el presente documento, el término “CDR” o “región determinante de la complementariedad” significa los sitios de combinación de antígeno no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252: 6609-6616 (1977) y Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y por MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), en los que las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia. La numeración única de IMGT para todas las regiones V de IG y TR de todas las especies se basa en la alta conservación de la estructura de la región variable (Lefranc, Mp et al., Dev comp. Immunol. 27:55-77, 2003). La numeración de IMGT, configurada después de alinear más de 5.000 secuencias, tiene en cuenta y combina la definición de la región estructural y las CDRs. La definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural. La definición de Contacto (MacCallum et al.) se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas y las interacciones anticuerpo-antígeno. Los restos de aminoácidos que abarcan las CDRs tal como se definen por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen para comparación. En una realización descrita en el presente documento, el término “CDR” es una CDR como se define por la definición de Kabat. En otra realización descrita en el presente documento, la CDR es una CDR como se define por IMGT.

Como se usa en el presente documento, la expresión “restos de aminoácidos estructurales (FR)” se refiere a aquellos aminoácidos en la región estructural de una cadena de Ig. La expresión “región estructural” o “región FR”, como se usa en el presente documento, incluye los restos de aminoácidos que son parte de la región variable, pero no son parte de las CDRs (por ejemplo, usando la definición de Contacto de las CDRs). Por lo tanto, una estructura de región variable tiene una longitud de aproximadamente 100-120 aminoácidos pero incluye solo aquellos aminoácidos fuera de las CDRs.

La presente descripción también abarca “sustituciones conservativas de aminoácidos” en las secuencias de aminoácidos de CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento, es decir, modificaciones de la secuencia de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo al antígeno, es decir, PAI-1. Una sustitución conservativa es una sustitución de un resto de aminoácido nativo por un resto no nativo de tal manera que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del resto de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, una sustitución conservativa resulta de la sustitución de un resto no polar en un polipéptido por cualquier otro resto no polar. Además, cualquier resto nativo en el polipéptido también se puede sustituir por alanina, como se ha descrito previamente para la “mutagénesis por barrido de alanina” (Cunningham et al., Science 244:1081-85 (1989)). Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, en la que una clase se define por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral del aminoácido y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas que se encuentran en la naturaleza, según se determina, por ejemplo, mediante una matriz de intercambio de frecuencia Dayhoff estándar o una matriz BLOSUM. Se han categorizado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos, e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro resto de clase III, tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservativa. De este modo, un resto de aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo contra PAI-1 se reemplaza por otro resto de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Brummell et al., Biochem. 32:1180, 1993; Kobayashi et al. Protein Eng. 12:879, 1999; y Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412, 1997). Las reglas generales para las sustituciones conservativas de aminoácidos se establecen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Sustituciones conservativas de aminoácidos

Restos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones seleccionadas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las sustituciones conservativas de aminoácidos también abarcan restos de aminoácidos no naturales que se incorporan típicamente por síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácidos.

Se espera que las modificaciones conservativas de la secuencia de aminoácidos (y las modificaciones correspondientes a los nucleótidos codificantes) produzcan anticuerpos contra PAI-1 que tengan características funcionales y químicas similares a las de los anticuerpos contra PAI-1 de origen natural. Por el contrario, pueden realizarse modificaciones sustanciales en las características funcionales o químicas de los anticuerpos contra PAI-1 seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de la sustitución, por ejemplo como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos naturales pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral:

1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;

3) ácidos: Asp, Glu;

4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

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

- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión “se une específicamente a” se refiere a la capacidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a un antígeno con un Kd que es menor que  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M, o menos. La expresión también abarca la capacidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno inespecífico.

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

Como se usa en el presente documento, el término “antígeno” se refiere al sitio de unión o epítipo reconocido por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término “vector” pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedante tras la introducción en la célula hospedante, y de este modo se replican junto con el genoma hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. Los términos “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente. Sin embargo, la descripción pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en la replicación), que cumplen funciones equivalentes.

- 35 Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para los fines descritos en el presente documento. Por ejemplo, una clase de vector usa elementos de ADN que derivan de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus del poliovirus, adenovirus, virus de la vacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV), o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistronicos con sitios internos de unión a ribosomas. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar mediante la introducción de uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedantes transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedante auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen marcador seleccionable puede enlazarse directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar, o pueden introducirse en la misma célula por cotransformación. También se pueden necesitar elementos adicionales para una síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias de señal, señales de ajuste, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación. En realizaciones particulares, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de región constante de cadena pesada y ligera (por ejemplo, humanos) sintéticos como se discutió anteriormente.

- 50 Más generalmente, una vez que se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, el vector de expresión puede introducirse en una célula hospedante apropiada. Es decir, las células hospedantes pueden transformarse. La introducción del plásmido en la célula hospedante se puede lograr mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección, e infección con virus intacto. Véanse, Ridgway, A. A. G. “Mammalian Expression Vectors” Chapter 24.2, p. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Una realización descrita en el presente documento es la introducción de plásmidos en el hospedante mediante electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se analizan para determinar la síntesis de proteínas de cadena pesada o ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “transformación” se usará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula hospedante receptora que cambia el genotipo y, en consecuencia, da como resultado un cambio en la célula receptora.

5 “Células hospedantes” se refiere a células que se han transformado con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procedimientos para el aislamiento de polipéptidos de hospedantes recombinantes, los términos “célula” y “cultivo celular” se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las “células” puede significar ya sea de células completas centrifugadas, o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

10 Debe entenderse que este término está destinado a referirse no solo a la célula sujeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión “célula hospedante” como se usa en el presente documento.

15 Como se usa en el presente documento, el término “tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en el presente documento. Los métodos de “tratamiento” emplean la administración a un sujeto, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a PAI-1 (por ejemplo, una enfermedad fibrótica) o predispuesto a tener dicha enfermedad o trastorno, para prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento.

Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad o trastorno asociado a PAI-1” incluye estados de enfermedad con o sin síntomas asociados a un estado de enfermedad, en el que se encuentran niveles o actividad alterados de PAI-1. Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados a PAI-1 incluyen varios tipos de fibrosis.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a PAI-1, que es suficiente para efectuar el tratamiento, pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado a PAI-1, como se describe aquí, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y la condición de la enfermedad a tratar, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición de la enfermedad, la forma de administración y similares, que puede determinar fácilmente un experto en la técnica. Las dosis para administración pueden oscilar, por ejemplo, de alrededor de 1 ng a alrededor de 10.000 mg, de alrededor de 1 ug a alrededor de 5.000 mg, de alrededor de 1 mg a alrededor de 1.000 mg, de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg, de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito aquí. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz también es aquella en la que los efectos beneficiosos minimizan o compensan los efectos tóxicos o perjudiciales (es decir, efectos secundarios) de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” o “mamífero” incluye cualquier animal humano o no humano.

40 Como se usa en el presente documento, el término “epítipo” se refiere a un determinante antigénico que interacciona con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como paratopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítipo. De este modo, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es aquel producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptido.

45 Se observa aquí que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

## II Anticuerpos anti-PAI-1

50 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a PAI-1 humano. En la Tabla 2 se exponen ejemplos de secuencias de aminoácidos de VH, VL y CDR y secuencias nucleotídicas de los anticuerpos descritos aquí. Las regiones CDR que se muestran en la Tabla 2 están definidas por IMGT.

# ES 2 770 507 T3

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

ANTICUERPO	SECUENCIA	SEQ ID NO
mA105 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSIYWIEWVKQRPG LGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAFMQLSS LTSEDSAVYYCARGGLYYDL DYWGQG TILTVSSAKTTPP	2
mA105 VL	DVVM TQTPLT LSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQ RPGQSPQRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLSRVEGA DLGVYYCWQDRHFPRTFGGGTKLEIKRAD	3
mA39 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQWVKQRP GHGLEWIGEILPGSNTNYNEKFKDKATFTADSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARLGIGLRGALDYWGQGTSTVTVSSAKTTPP	4
mA39 VL	DIQMTHSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLA WYH QKQGKS PQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGGTQFSLN I KSLQPEDFGTFY CQHRYGSPWTFGGG TKLEIKRAD	5
mA44 VH	EMQLQESGPSLVKPSQTLSTLCSVTGDSMTNGYWNWIRKFPG NKLEYMGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRNTSKNQYYLQLSSV TTEDTATYYCARWHYGSPYYFDYWGQGTTTLTVSSAKTTPP	6
mA44 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWLQKPGKS PKTLIYRANRSVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYY CLQYDEFPTFGGGTKLEIKRAD	7
mA71 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQRPG HGLDWIGEILPGSGNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTVYMQLS SLTSEDSAVYYCARGGLYYNLD SWGQGTTTLTVSSAKTTPP	8
mA71 VL	DVVM TQTPLT LSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLYWLLQ RPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCWQDTHFPRTFGGGTKLEIKRAD	9

# ES 2 770 507 T3

mA75 VH	<p>QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIAWLKQRPG HGLEWIAEILPGSGLTNYNEIFRGKATFTADTSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARGGLYYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTAP</p>	80
mA75 VL	<p>DVVMQTQPLTSLVTIGQPASICKSSQSLLDSEGKTYLNWLFQR PGQSPKRLIYLVCKLDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEGED LGVYYCWQGSHPQTFGGGTKLEIKRAD</p>	81
mB109 VH	<p>EVQLQQSGSVLARPGTISVKMSCKASGYSTFISYWMHWVKQR QGQLEWMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDTTYNQKFEDK AKLTAVASASTAYMEVSSLTNEDSAVYYCTRGLRRWGAMD YWGQGTSTVTVSSAKTTPP</p>	10
mB109 VL	<p>DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSIPCKASQDVSSAVAWYQQKLG QSPKLLIYSASFRTYGVDPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAV YYCQQHYSSPYTFGGGTNLEIKRAD</p>	11
mB28 VH	<p>QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQRPGG LEWIGKILPGSGGANYNEKFKGKATVTADTSSNTVYMQLSSL TSEDSAVYYCARLSTGTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP</p>	12
mB28 VL	<p>DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVYSYLAWYQQKQKG SPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGGTQFSLKINYLQPEDFGS YYCQHHYGTPTFGGGTKVEIKRAD</p>	13
mC45 VH	<p>QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPG QGLEWIGVIHPGSGVTNYNEKFKGKAILTADKSSSTAYMQLSS LTSDDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGTSTVTVSS</p>	14
mC45 VL	<p>DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKS PKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYY CLQYDEFPRTFGGGTKLEIK</p>	15

ES 2 770 507 T3

mE16 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQTPE KGLGWVASLRTGGNTYYSDSVKGRFTISRDNDRNLYLQMSS LTSEDTAVYYCARGLRHWGYFDVWGAGTTVTVSS	16
mE16 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVSTAVGWYQQEPG QSPKLLIYSASNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAV YYCQQHYSSPWTFGGGTKLEIK	17
mE21 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRP EQGLEWIGWIDPENGDTFYDPKFQAKATMTADTSSNTAYLQL SSLTSEDTAVYYCMYGNYPYYFDYWGQGTTTLTVSS	18
mE21 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPWTFGGGTKLEIK	19
mA105 HCDR3	ARGGLYYDLDY	20
mA105 HCDR2	ILPGSGST	21
mA105 HCDR1	GFTFSIYW	22
mA105 LCD3	WQDRHFPRT	23
mA105 mA71 LCDR2	LVS	24
mA105 mA71 LCDR1	QSLDSDGKTY	25
mA39 HCDR3	ARLGIGLRGALDY	26
mA39 HCDR2	ILPGSNT	27
mA39 HCDR1	GYTFNIYW	28
mA39 LCDR3	QHRYGSPWT	29
mA39 LCDR2	NAK	30
mA39 LCDR1	ENIYSY	31
mA44 HCDR3	ARWHYGSPYYFDY	32
mA44 HCDR2	ITYSGST	33
mA44 HCDR1	GDSMTNGY	34
mA44 LCDR3	LQYDEFPT	35
mA44 LCDR2	RAN	36
mA44 LCDR1	QDINSY	37

# ES 2 770 507 T3

mA71 HCDR3	ARGGLYYNLDS	38
mA71 HCDR2	ILPGSGNT	39
mA71 HCDR1	GFTFSTYW	40
mA71 LCDR3	WQDTHFPRT	41
mA71 LCDR2	LVS	42
mA71 LCDR1	QSLDSDGKTY	43
mA75 HCDR3	ARGGLYYAMDY	44
mA75 HCDR2	ILPGSGLT	45
mA75 HCDR1	GFTFSTYW	46
mA75 LCDR3	WQGSHPQT	47
mA75 LCDR2	LVC	48
mA75 LCDR1	QSLDSEGKTY	49
mB109 HCDR3	TRGLRRWGAMDY	50
mB109 HCDR2	ILPGSGLT	51
mB109 HCDR1	GFTFSTYW	52
mB109 LCDR3	QQHYSSPYT	53
mB109 LCDR2	SAS	54
mB109 LCDR1	QDVSSA	55
mB28 HCDR3	ARLSTGTRGAFDY	56
mB28 HCDR2	ILPGSGGA	57
mB28 HCDR1	GYTFSISW	58
mB28 LCDR3	QHHYGPPT	59
mB28 LCDR2	NAK	60
mB28 LCDR1	ENVYSY	61
mC45 HCDR3	ARDYYGSSHGLMDY	62
mC45 HCDR2	IHPGSGVT	63
mC45 HCDR1	GYAFTNYL	64
mC45 LCDR3	LQYDEFPT	65
mC45 LCDR2	RAN	66
mC45 LCDR1	QDINSY	67
mE16 HCDR3	ARGLRHWGYFDV	68
mE16 HCDR2	LRTGGNT	69
mE16 HCDR1	GFTFSNYG	70
mE16 LCDR3	QQHYSSPWT	71
mE16 LCDR2	SAS	72

mE16 LCDR1	QDISNY	73
mE21 HCDR3	MYGNYPYYFDY	74
mE21 HCDR2	IDPENGDT	75
mE21 HCDR1	GFNIKDY	76
mE21 LCDR3	QQGNTLPWT	77
mE21 LCDR2	YTS	78
mE21 LCDR1	QDISNY	79
m= murino; VH=cadena pesada variable; VL=cadena ligera variable;		

En otra realización, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-PAI-1 que se unen al mismo epítipo o inhiben de manera competitiva un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región VH y VL expuestas en las SEQ ID NO: 6 y 7 respectivamente. Dichos anticuerpos pueden identificarse usando ensayos de unión competitiva de rutina que incluyen, por ejemplo, ensayos de competencia basados en resonancia de plasmones superficiales (SPR).

### III. Anticuerpos anti-PAI-1 modificados

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PAI-1 descritos aquí pueden comprender una o más modificaciones. Las formas modificadas de anticuerpos anti-PAI-1 descritos en el presente documento pueden obtenerse usando cualquier técnica conocida en la técnica.

#### i) Reducción de la inmunogenicidad

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos aquí, se modifican para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden ser quimerizados, humanizados o desinmunizados.

En una realización, un anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos aquí, pueden ser quiméricos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como los anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos, o fragmentos de los mismos, son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202, 1985; Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986; Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191, 1989; Patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851, 1984; Neuberger et al., Nature 312:604, 1984; Takeda et al., Nature 314:452, 1985) pueden emplearse para la síntesis de dichas moléculas. Por ejemplo, una secuencia genética que codifica una especificidad de unión de una molécula de anticuerpo anti-PAI-1 de ratón puede fusionarse junto con una secuencia de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo anticuerpos humanizados.

En otra realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, está humanizado. Los anticuerpos humanizados tienen una especificidad de unión que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo no humano y regiones estructurales de una molécula de anticuerpo humano. A menudo, los restos estructurales en las regiones estructurales humanas se sustituirán por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar o mejorar la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo modelando las interacciones de la CDR y los restos estructurales para identificar los restos estructurales importantes para la unión al antígeno, y la comparación de secuencias para identificar restos estructurales inusuales en posiciones particulares. Véanse, por ejemplo, Queen et al., Patente U.S. n<sup>o</sup> 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332:323, 1988. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; Publicación Internacional n<sup>o</sup> WO 91/09967; Patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), remodelación de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28:489, 1991; Studnicka et al., Protein Engineering 7:805, 1994; Roguska. et al., PNAS 91:969, 1994), y barajado de cadenas (Patente U.S. n<sup>o</sup> 5.565.332).

En una realización particular, se emplea un método de humanización que se basa en el impacto de la flexibilidad molecular del anticuerpo durante y en el reconocimiento inmune (véase la Publicación Internacional n<sup>o</sup>

WO2009/032661). La flexibilidad de la proteína está relacionada con el movimiento molecular de la molécula de proteína. La flexibilidad de la proteína es la capacidad de una proteína completa, una parte de una proteína o un solo resto de aminoácido para adoptar un conjunto de conformaciones que difieren significativamente entre sí. Se puede obtener información sobre la flexibilidad de las proteínas realizando experimentos de cristalografía de rayos X de proteínas (véase, por ejemplo, Kundu et al., *Biophys. J.* 83:723, 2002), experimentos de resonancia magnética nuclear (véase, por ejemplo, Freedberg et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:7916, 1998) o ejecutando simulaciones de dinámica molecular (MD). Una simulación MD de una proteína se realiza en un ordenador, y permite determinar el movimiento de todos los átomos de proteínas durante un período de tiempo calculando las interacciones físicas de los átomos entre sí. El resultado de una simulación MD es la trayectoria de la proteína estudiada durante el período de tiempo de la simulación. La trayectoria es un conjunto de conformaciones proteicas, también llamadas instantáneas, que se muestrean periódicamente durante el período de la simulación, por ejemplo cada 1 picosegundo (ps). Mediante el análisis del conjunto de instantáneas se puede cuantificar la flexibilidad de los restos de aminoácidos de la proteína. De este modo, un resto flexible es aquel que adopta un conjunto de conformaciones diferentes en el contexto del polipéptido dentro del cual reside ese resto. Los métodos de MD son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, Nueva York, 1988). Varios software permiten simulaciones MD, tales como Amber (véanse Case et al. *J. Comp. Chem.* 26:1668, 2005; Brooks et al. *J. Comp. Chem.* 4:187, 1983; y MacKerell et al. (1998) en "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) o Impact (véase Rizzo et al. *J. Am. Chem. Soc.*; 122:12898, 2000).

La mayoría de los complejos de proteínas comparten una superficie enterrada relativamente grande y plana, y se ha demostrado que la flexibilidad de las parejas de unión proporciona el origen de su plasticidad, lo que les permite adaptarse conformacionalmente entre sí (Sundberg y Mariuzza, *Structure* 8, R137-R142, 2000). Como tal, se ha demostrado que los ejemplos de "ajuste inducido" desempeñan un papel dominante en las interfaces proteína-proteína. Además, cada vez hay más datos que muestran que las proteínas realmente se unen a ligandos de diversas formas, tamaños y composiciones (*Protein Science* 11:184-187, 2002), y que la diversidad conformacional parece ser un componente esencial de la capacidad de reconocer diferentes parejas (James et al., *Science* 299:1362, 2003). Los restos flexibles están implicados en la unión de las parejas proteína-proteína (Grunberg et al., *Structure* 14, 683, 2006).

Los restos flexibles pueden adoptar una variedad de conformaciones que proporcionan un conjunto de áreas de interacción que probablemente son reconocidas por las células B de memoria y desencadenan una respuesta inmunogénica. De este modo, un anticuerpo puede humanizarse modificando una serie de restos de la estructura de modo que el conjunto de conformaciones y áreas de reconocimiento mostradas por el anticuerpo modificado se asemeje tanto como sea posible a las adoptadas por un anticuerpo humano. Esto se puede lograr modificando un número limitado de restos: (1) construyendo un modelo de homología del mAb parental y ejecutando una simulación MD; (2) analizando los restos flexibles e identificando los restos más flexibles de una molécula de anticuerpo no humano, así como identificando restos o motivos que puedan ser una fuente de heterogeneidad o de reacción de degradación; (3) identificando un anticuerpo humano que muestra el conjunto más similar de áreas de reconocimiento que el anticuerpo parental; (4) determinando los restos flexibles a mutar, también se mutan los restos o motivos que probablemente sean una fuente de heterogeneidad y degradación; y (5) verificando la presencia de epítopos conocidos de células T o células B. Los restos flexibles se pueden encontrar usando un cálculo de MD como se enseña aquí usando un modelo de disolvente implícito, que explica la interacción del disolvente de agua con los átomos de proteína durante el período de tiempo de la simulación.

Una vez que se ha identificado el conjunto de restos flexibles dentro de las cadenas ligeras y pesadas variables, se identifica un conjunto de estructuras de región variable de cadena ligera y pesada humana que se parecen mucho a los del anticuerpo de interés. Eso se puede hacer, por ejemplo, usando una búsqueda BLAST en el conjunto de restos flexibles contra una base de datos de secuencia de línea germinal humana del anticuerpo. También se puede hacer comparando la dinámica del mAb parental con la dinámica de una biblioteca de estructuras canónicas de línea germinal. Los restos de CDR y los restos vecinos se excluyen de la búsqueda para garantizar que se conserva una alta afinidad por el antígeno. Entonces se reemplazan los restos flexibles.

Cuando varios restos humanos muestran homólogías similares, la selección también depende de la naturaleza de los restos que pueden afectar el comportamiento de la disolución del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, los restos polares a menudo aparecerán en bucles flexibles expuestos a lo largo de restos hidrófobos. Los restos que son una fuente potencial de inestabilidad y heterogeneidad también están mutados incluso si se encuentran en las CDRs. Eso incluirá metioninas expuestas, ya que la formación de sulfóxido puede ser el resultado de radicales de oxígeno, la escisión proteolítica de enlaces lábiles ácidos como los del dipéptido Asp-Pro (*Drug Dev. Res.* 61:137, 2004), sitios de desamidación encontrados con un resto de asparagina expuesto seguido de un pequeño aminoácido, tal como Gly, Ser, Ala, His, Asn o Cys (*J. Chromatog.* 837:35, 2006), y sitios N-glicosilación, tal como el sitio Asn-X-Ser/Thr. Típicamente, las metioninas expuestas se sustituirán por una Leu, las asparaginas expuestas se sustituirán por una glutamina o un aspartato, o el resto posterior se cambiará. Para el sitio de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), se cambiará el resto Asn o Ser/Thr.

La secuencia de anticuerpos compuesta resultante se verifica para detectar la presencia de epítopos de células B o de células T lineales conocidos. Se realiza una búsqueda, por ejemplo, con la Immune Epitope Data Base (IEDB)

disponible públicamente (PLOS Biol. (2005) 3(3)e91). Si se encuentra un epítipo conocido dentro de la secuencia compuesta, se recupera y sustituye otro conjunto de secuencias humanas. De este modo, a diferencia del método de remodelado de la superficie de la Patente U.S. nº 5.639.641, el método aborda tanto las respuestas inmunogénicas mediadas por células B como por células T. El método también evita el problema de la pérdida de actividad que a veces se observa con el injerto de CDR (Patente U.S. nº 5.530.101). Además, los problemas de estabilidad y solubilidad también se consideran en el proceso de ingeniería y selección, lo que da como resultado un anticuerpo que está optimizado para baja inmunogenicidad, alta afinidad por el antígeno, y propiedades biofísicas mejoradas.

En algunas realizaciones, la desinmunización puede usarse para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para modificar los epítopos de células T (véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales nºs WO9852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, se pueden analizar las secuencias VH y VL del anticuerpo de partida y se puede generar un "mapa" de epítopos de células T humanas a partir de cada región V que muestra la ubicación de los epítopos en relación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y otros restos clave dentro la secuencia. Los epítopos de células T individuales del mapa de epítopos de células T se analizan para identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña un intervalo de secuencias alternativas de VH y VL que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos, y estas secuencias se incorporan posteriormente en un intervalo de anticuerpos específicos de PAI-1 o fragmentos de los mismos para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento, que entonces se prueban para determinar la función. Típicamente, se generan y prueban entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes completos de cadena pesada y ligera que comprenden regiones V modificada y C humana se clonan entonces en vectores de expresión, y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Los anticuerpos se comparan entonces en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

#### ii) Funciones efectoras y modificaciones de Fc

Los anticuerpos anti-PAI-1 descritos aquí pueden comprender una región constante de anticuerpo (por ejemplo, una región constante de IgG, una región constante de IgG humana, una región constante de IgG1 o IgG4 humana) que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante de anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar involucrada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células a través de la región Fc, uniéndose un sitio de unión al receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares desencadena una cantidad de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la engulción y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos inmunes, la lisis de las células diana recubiertas de anticuerpos por células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos aquí, se unen a un receptor de Fc-gamma. En realizaciones alternativas, los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en el presente documento pueden comprender una región constante que carece de una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad de ADCC) o que no puede unirse al receptor de Fc.

Ciertas realizaciones descritas en el presente documento incluyen anticuerpos anti-PAI-1 en los que se ha eliminado o alterado al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de la región constante para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas o mejoradas, la capacidad para dimerizarse de forma no covalente, mayor capacidad de localización en un sitio particular del cuerpo (por ejemplo, el sitio de un tumor o un órgano particular), semivida reducida en suero o semivida en suero aumentada en comparación con un anticuerpo completo, inalterado, de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos con dominio eliminado que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo se eliminará todo o parte del dominio CH2.

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

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

En ciertas realizaciones, un dominio de Fc empleado en un anticuerpo descrito aquí es una variante de Fc. Como se usa en el presente documento, la expresión "variante de Fc" se refiere a un dominio de Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácidos con respecto al dominio de Fc de tipo salvaje del que deriva dicho dominio de Fc. Por ejemplo, en el que el dominio de Fc deriva de un anticuerpo IgG1 humano, la variante de Fc de dicho dominio de Fc de IgG1 humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a dicho dominio de Fc.

La sustitución o sustituciones de aminoácidos de una variante de Fc puede ubicarse en cualquier posición (es decir, cualquier posición de aminoácido de la convención de la UE) dentro del dominio de Fc. En una realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio de bisagra o porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH2 o una porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH3 o una porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido ubicada en un dominio CH4 o una porción del mismo.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden emplear cualquier variante de Fc reconocida en la técnica que se sabe que imparte una mejora (por ejemplo, reducción o mejora) en la función efectora o la unión de FcR. Dichas variantes de Fc pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas en las Publicaciones Internacionales PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2, o la patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; y 7.083.784. En una realización ejemplar, un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 268 de EU (por ejemplo, H268D o H268E). En otra realización ejemplar, un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender una sustitución de aminoácidos en la posición 239 de EU (por ejemplo, S239D o S239E) o la posición 332 de EU (por ejemplo, I332D o I332Q).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera las funciones efectoras independientes del antígeno del anticuerpo, en particular la semivida circulante del anticuerpo. Dichos anticuerpos exhiben una unión aumentada o disminuida a FcRn en comparación con los anticuerpos que carecen de estas sustituciones, por lo tanto, tienen una semivida aumentada o disminuida en el suero, respectivamente. Se anticipa que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tienen semividas en suero más largas, y tales moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos en los que se desea una semivida prolongada del anticuerpo administrado, por ejemplo para tratar una enfermedad o trastorno crónico. Por el contrario, se espera que las variantes de Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida tengan semividas más cortas, y tales moléculas también son útiles, por ejemplo, para la administración a un mamífero en la que un tiempo de circulación reducido puede ser ventajoso, por ejemplo para imágenes de diagnóstico in vivo o en situaciones en las que el anticuerpo inicial tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante períodos prolongados. Las variantes de Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida también tienen menos probabilidades de cruzar la placenta y, de este modo, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que puede desearse una afinidad de unión a FcRn reducida incluyen aquellas aplicaciones en las que se desea la localización en el cerebro, riñón o hígado. En una realización ejemplar, los anticuerpos alterados descritos en el presente documento exhiben un transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos renales desde la vasculatura. En otra realización, los anticuerpos alterados descritos en el presente documento exhiben un transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB) desde el cerebro hacia el espacio vascular. En una realización, un anticuerpo con unión a FcRn alterada comprende un dominio de Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio de Fc. El bucle de unión a FcRn está compuesto por restos de aminoácidos 280-299 (según la numeración de Kabat). Ejemplos de sustituciones de aminoácidos que alteraron la actividad de unión a FcRn se describen en la Publicación Internacional PCT n<sup>o</sup> WO05/047327. En ciertas realizaciones ejemplares, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos aquí

comprenden un dominio de Fc que tiene una o más de las siguientes sustituciones: V284E, H285E, N286D, K290E, y S304D (numeración de Kabat).

En otras realizaciones, los anticuerpos, para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento tienen una región constante, por ejemplo una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4, que se altera para reducir o eliminar la glicosilación. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento también puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera la glicosilación del anticuerpo. Por ejemplo, dicha variante de Fc puede tener una glicosilación reducida (por ejemplo, glicosilación ligada a N u O). En realizaciones ejemplares, la variante de Fc comprende una glicosilación reducida del glicano unido a N que normalmente se encuentra en la posición de aminoácido 297 (numeración de EU). En otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución de aminoácidos cerca o dentro de un motivo de glicosilación, por ejemplo un motivo de glicosilación unido a N que contiene la secuencia de aminoácidos NXT o NXS. En una realización particular, el anticuerpo comprende una variante de Fc con una sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácido 228 o 299 (numeración de EU). En realizaciones más particulares, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 o IgG4 que comprende una mutación S228P y T299A (numeración de EU).

Ejemplos de sustituciones de aminoácidos que confieren glicosilación reducida o alterada se describen en la Publicación Internacional PCT n° WO05/018572. En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos aquí, se modifican para eliminar la glicosilación. Dichos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden denominarse anticuerpos "agly", o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos "agly"). Aunque no está limitado por la teoría, se cree que los anticuerpos "agly", o fragmentos de los mismos, pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado in vivo. Los ejemplos de anticuerpos agly, o fragmentos de los mismos, comprenden una región Fc aglicosilada de un anticuerpo IgG4 que carece de la función efectora Fc, eliminando así el potencial de toxicidad mediada por Fc para los órganos vitales normales que expresan PAI-1. En aún otras realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos aquí comprenden un glicano alterado. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un número reducido de restos de fucosa en un N-glicano en Asn297 de la región Fc, es decir, está afucosilado. En otra realización, el anticuerpo puede tener un número alterado de restos de ácido siálico en el N-glicano en Asn297 de la región Fc.

### iii) Unión covalente

Los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en el presente documento pueden modificarse, por ejemplo, mediante la unión covalente de una molécula al anticuerpo, de tal manera que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo afín. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos aquí pueden modificarse por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otras proteínas, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, la escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en el presente documento pueden además fusionarse de manera recombinante a un polipéptido heterólogo en el término N o C, o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PAI-1 pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos, o toxinas. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales PCT n°s WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente U.S. n° 5.314.995; y EP 396.387.

Los anticuerpos anti-PAI-1 pueden fusionarse a polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida in vivo o para uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, el PEG puede conjugarse con los anticuerpos anti-PAI-1 descritos aquí para aumentar su semivida in vivo. (Leong, S. R., et al., Cytokine 16:106, 2001; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531, 2002; o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512, 2002).

Además, los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en el presente documento pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), pero no se limitan a, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767, 1984), y la etiqueta "flag".

Los anticuerpos anti-PAI-1 descritos en el presente documento pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana, o para la obtención de imágenes o terapia del paciente. Los

anticuerpos anti-PAI-1 descritos en el presente documento pueden marcarse o conjugarse antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los anticuerpos anti-PAI-1 descritos aquí pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, o PEG.

La presente descripción abarca además anticuerpos anti-PAI-1 conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos anti-PAI-1 se pueden usar de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o la progresión de un trastorno de las células inmunes (por ejemplo, CLL) como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento o de prevención determinado. La detección se puede facilitar acoplando los anticuerpos anti-PAI-1 a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico como se describe en el presente documento. Ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos no limitantes de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos no limitantes de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, o ficoeritrina; un ejemplo no limitante de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos no limitantes de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos no limitantes de material radiactivo adecuado incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In o <sup>99</sup>Tc.

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

En otra realización, un anticuerpo anti-PAI-1 para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento puede conjugarse con una molécula que disminuye el crecimiento de células tumorales. En otras realizaciones, las composiciones descritas pueden comprender anticuerpos, o fragmentos de los mismos, acoplados a fármacos o profármacos. Aún otras realizaciones descritas en el presente documento comprenden el uso de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, conjugados con biotoxinas específicas o sus fragmentos citotóxicos tales como ricina, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina de la difteria. La selección del anticuerpo conjugado o no conjugado que se usará dependerá del tipo y el estadio del cáncer, el uso del tratamiento complementario (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa), y la condición del paciente. Se apreciará que un experto en la técnica podría hacer fácilmente tal selección en vista de las enseñanzas aquí.

Se apreciará que, en estudios previos, los anticuerpos antitumorales marcados con isótopos se han usado con éxito para destruir células tumorales en modelos animales y, en algunos casos, en seres humanos. Los radioisótopos ejemplares incluyen: <sup>90</sup>Y, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>105</sup>Rh, <sup>153</sup>Sm, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>166</sup>Ho, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re y <sup>188</sup>Re. Los radionúclidos actúan produciendo radiación ionizante que provoca la ruptura de múltiples cadenas en el ADN nuclear, lo que conduce a la muerte celular. Los isótopos usados para producir conjugados terapéuticos típicamente producen partículas alfa o beta de alta energía que tienen una longitud de trayectoria corta. Tales radionúclidos matan las células a las que están muy cerca, por ejemplo, las células neoplásicas a las que el conjugado se ha unido o ha entrado. Tienen poco o ningún efecto sobre las células no localizadas. Los radionúclidos son esencialmente no inmunogénicos.

#### IV. Expresión de anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos anti-PAI-1 descritos aquí como se establece anteriormente, los genes se insertan típicamente en un vector de expresión para su introducción en células hospedantes que pueden usarse para producir la cantidad deseada de los anticuerpos reivindicados, o fragmentos de los mismos.

En otras realizaciones, los anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de los mismos, descritos en el presente documento, pueden expresarse usando constructos policistrónicos. En tales sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de un solo constructo policistrónico. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos descritos aquí en células hospedantes eucariotas. Secuencias IRES compatibles se describen en la patente U.S. nº 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que tales sistemas de expresión pueden usarse para producir eficazmente la gama completa de polipéptidos descritos en la presente solicitud.

En una realización, la línea celular hospedante usada para la expresión de anticuerpos es de origen mamífero; los expertos en la técnica pueden determinar líneas celulares hospedantes particulares que son más adecuadas para el

producto génico deseado que se expresará en ellas. Las líneas de células hospedantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno SV40 T), R1610 (fibroblastos de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona glicosilación alterada, por ejemplo afucosilación, del anticuerpo expresado a partir de la misma (por ejemplo, PER.C6.RTM. (Crucell) o líneas celulares CHO sin FUT8 (Potelligent.RTM. Cells) (Biowa, Princeton, N.J.)). En una realización, se pueden usar células NS0. Las células CHO pueden usarse en ciertas realizaciones específicas. Las líneas celulares hospedantes están típicamente disponibles en los servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection, o en la bibliografía publicada.

La producción *in vitro* permite el aumento de escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejidos son conocidas en la técnica, e incluyen el cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo en un reactor aéreo o en un reactor agitador continuo, o en cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, microperlas de agarosa, o cartuchos cerámicos. Si es necesario o se desea, las disoluciones de polipéptidos se pueden purificar por los métodos habituales de cromatografía, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa, o cromatografía de (inmuno)afinidad.

Los genes que codifican los anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de los mismos, descritos aquí también pueden expresarse en células no mamíferas tales como bacterias o levaduras o células vegetales. A este respecto, se apreciará que también pueden transformarse diversos microorganismos unicelulares no mamíferos tales como bacterias; es decir, aquellos capaces de crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como las cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos pueden convertirse en parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos deben aislarse, purificarse y entonces ensamblarse en moléculas funcionales.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos eucariotas, aunque una serie de otras cepas están comúnmente disponibles. Para la expresión en *Saccharomyces*, el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)) se usa comúnmente. Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo ATCC nº 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* como una característica del genoma de la célula hospedante de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

#### V. Formulaciones farmacéuticas y métodos de administración de anticuerpos anti-PAI-1.

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

Los métodos de preparación y administración de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en el presente documento a un sujeto son bien conocidos por los expertos en la técnica o los determinan fácilmente. La vía de administración de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos aquí puede ser oral, parenteral, mediante inhalación, o tópica. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal, o vaginal. Las formas de administración parenteral intravenosa, intraarterial, subcutánea e intramuscular pueden usarse en ciertas realizaciones. Si bien todas estas formas de administración se contemplan claramente dentro del alcance descrito en el presente documento, una forma de administración sería una disolución inyectable, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o por goteo. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un amortiguador (por ejemplo, amortiguador de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas del presente documento, los polipéptidos pueden administrarse directamente al sitio de la población celular adversa aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen disolución salina y medios amortiguados. Como se describe en el presente documento, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, amortiguador de fosfato 0,01-0,1 M (por ejemplo 0,05 M) o disolución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los que se basan en la dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes,

agentes quelantes, y gases inertes, y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y, en una realización, se preservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En ciertas realizaciones, se incluyen agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo solo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados aquí, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación pueden ser el secado a vacío y la liofilización, lo que produce un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente filtrada estéril del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se llenan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringuillas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de un kit tales como las descritas en U.S. Ser. nº 09/259.337 y U.S. Ser. nº 09/259.338 en trámite junto con la presente. Dichos artículos de fabricación tendrán en una realización etiquetas o insertos de paquete que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos autoinmunes o neoplásicos.

Las dosis eficaces de los anticuerpos estabilizados, o fragmentos de los mismos, descritos aquí, para el tratamiento de las afecciones descritas previamente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento pueden ajustarse usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica, para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo descrito en el presente documento, la dosificación puede variar, por ejemplo, de alrededor de 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedante. Por ejemplo, las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, o en realizaciones particulares, al menos 1 mg/kg. Las dosis intermedias en los intervalos anteriores también pretenden estar dentro del alcance descrito en el presente documento.

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

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos descritos aquí pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de polipéptido o molécula diana en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una cierta concentración de anticuerpos o toxinas en plasma, por ejemplo 1-1000 ug/ml o 25-300 ug/ml. Alternativamente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían según la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. En una realización, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en el presente documento pueden administrarse en forma no conjugada. En otra realización, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden administrarse múltiples veces en forma conjugada. En todavía otra realización, los anticuerpos, o

fragmentos de los mismos, descritos aquí pueden administrarse en forma no conjugada, después en forma conjugada, o viceversa.

La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que aún no se encuentra en estado de enfermedad, para mejorar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis profiláctica eficaz". En este uso, las cantidades precisas nuevamente dependen del estado de salud del paciente y de la inmunidad general, pero generalmente varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente 0,5 a 2,5 mg por dosis. Se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta (por ejemplo, de alrededor de 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, usándose más comúnmente dosis de 5 a 25 mg para radioinmunoconjugados, y dosis más altas para moléculas conjugadas de citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y, en realizaciones particulares, hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

En una realización, un sujeto puede tratarse con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en el presente documento (por ejemplo, en un vector). Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos varían de alrededor de 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 ug a 10 mg, o 30-300 ug de ADN por paciente. Las dosis para los vectores víricos infecciosos varían de 10 a 100, o más, viriones por dosis.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico o terapéutico. La inyección intramuscular o la infusión intravenosa se pueden usar para la administración de un anticuerpo descrito en el presente documento. En algunos métodos, los anticuerpos terapéuticos, o fragmentos de los mismos, se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™.

Los agentes descritos en el presente documento pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesita tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Agentes adicionales son aquellos que son reconocidos en la técnica y se administran rutinariamente para un trastorno particular.

Las dosis de tratamiento único eficaces (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos marcados con <sup>90</sup>Y descritos aquí oscilan entre alrededor de 5 y alrededor de 75 mCi, y en una realización, entre alrededor de 10 y alrededor de 40 mCi. Las dosis no ablativas de médula eficaces de tratamiento único de anticuerpos marcados con <sup>131</sup>I oscilan entre alrededor de 5 y alrededor de 70 mCi, y en una realización, entre alrededor de 5 y alrededor de 40 mCi. Las dosis ablativas eficaces de un solo tratamiento (es decir, pueden requerir un trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos marcados con <sup>131</sup>I oscilan entre alrededor de 30 y alrededor de 600 mCi, y en una realización, entre alrededor de 50 y menos de alrededor de 500 mCi. Junto con un anticuerpo quimérico modificado, debido a la semivida en circulación más prolongada frente a los anticuerpos murinos, las dosis no ablativas de médula eficaces de tratamiento único de anticuerpos quiméricos marcados con yodo <sup>131</sup> oscilan entre alrededor de 5 y alrededor de 40 mCi, y en una realización, menos de alrededor de 30 mCi. Los criterios de formación de imagen para, por ejemplo, el marcador <sup>111</sup>In, son típicamente menores de alrededor de 5 mCi.

Si bien se ha adquirido una gran experiencia clínica con <sup>131</sup>I y <sup>90</sup>Y, otros radiomarcadores son conocidos en la técnica y se han usado para fines similares. Todavía se usan otros radioisótopos para obtener imágenes. Por ejemplo, los radioisótopos adicionales que son compatibles con el alcance de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>57</sup>Co, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>77</sup>Br, <sup>81</sup>Rb, <sup>81</sup>Kr, <sup>87</sup>Sr, <sup>113</sup>In, <sup>127</sup>Cs, <sup>129</sup>Cs, <sup>132</sup>I, <sup>197</sup>Hg, <sup>203</sup>Pb, <sup>206</sup>Bi, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>212</sup>Pb, <sup>212</sup>Bi, <sup>47</sup>Sc, <sup>105</sup>Rh, <sup>109</sup>Pd, <sup>153</sup>Sm, <sup>188</sup>Re, <sup>199</sup>Au, <sup>225</sup>Ac, <sup>211</sup>A, <sup>213</sup>Bi. A este respecto, los emisores alfa, gamma y beta son compatibles con la presente descripción. Además, en vista de la presente descripción, se afirma que un experto en la técnica podría determinar fácilmente qué radionúclidos son compatibles con un curso de tratamiento seleccionado sin experimentación excesiva. Con este fin, los radionúclidos adicionales que ya se han usado en el diagnóstico clínico incluyen <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>99</sup>Tc, <sup>43</sup>K, <sup>52</sup>Fe, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, así como <sup>111</sup>In. Los anticuerpos también se han marcado con una variedad de radionúclidos para su uso potencial en inmunoterapia dirigida (Peirersz et al. Immunol. Cell Biol. 65: 111, 1987). Estos radionúclidos incluyen <sup>188</sup>Re y <sup>186</sup>Re, así como <sup>199</sup>Au y <sup>67</sup>Cu en menor medida. La patente U.S. n° 5.460.785 proporciona datos adicionales con respecto a tales radioisótopos.

Como se discutió previamente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos aquí, se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento in vivo de trastornos de mamíferos. A este respecto, se apreciará que los anticuerpos descritos, o fragmentos de los mismos, se formularán para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. En ciertas realizaciones, las composiciones

farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden un vehículo estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina fisiológica, amortiguadores no tóxicos, conservantes, y similares. Para los fines de la presente solicitud, se considerará que una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento, conjugado o no conjugado con un agente terapéutico, significa una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a una diana y lograr un beneficio, por ejemplo para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o detectar una sustancia o una célula. En el caso de las células tumorales, el polipéptido en ciertas realizaciones será capaz de interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento en la muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido.

De acuerdo con el alcance de la presente descripción, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden administrarse a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden administrarse a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo descrito en el presente documento con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional de acuerdo con técnicas conocidas. Un experto en la técnica reconocerá que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con el que se combinará, la vía de administración, y otras variables bien conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán además que un cóctel que comprende una o más especies de polipéptidos como se describe en el presente documento puede resultar particularmente eficaz.

#### VI. Métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a PAI-1

Los anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de los mismos, descritos aquí son útiles para antagonizar la actividad de PAI-1. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar enfermedades o trastornos asociados a PAI-1 mediante la administración a un sujeto que lo necesita de una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos anti-PAI-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos aquí.

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

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

La opción de tratamiento actualmente disponible y eficaz como Seprafilm® tiene limitaciones para uso solo en acceso abierto (laparotomía), y no se puede usar en la laparoscopia. La búsqueda de un posible tratamiento está en curso.

En ciertas realizaciones ejemplares, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden emitirse para tratar la fibrosis renal y la lesión renal aguda asociada, así como las enfermedades renales crónicas que son las principales causas de insuficiencia renal en etapa terminal.

Un experto en la técnica podría, mediante experimentación de rutina, determinar qué cantidad eficaz y no tóxica de anticuerpo (o agente terapéutico adicional) sería con el fin de tratar una enfermedad o trastorno asociado con PAI-1. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido puede variar según factores como el estadio de la enfermedad (por ejemplo, estadio I frente a estadio IV), edad, sexo, complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunodeprimidas), y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas, o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En general, sin embargo, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de alrededor de 0,05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, y en una realización, de alrededor de 0,5 a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal por día.

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

Algunos aspectos y realizaciones particulares que sirven además para ilustrar la presente invención se dan a continuación:

## Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes adicionales.

Además, de acuerdo con la presente invención, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la pericia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (aquí "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

### **Ejemplo 1: Generación de hibridomas: Inmunización de ratones con proteína PAI-1 y generación de anticuerpos**

Se desarrollaron anticuerpos que reaccionarían de forma cruzada con el PAI-1 activo humano (h) y de macaco (cyno) (forma glicosilada o no glicosilada) y que neutralizaría la actividad inhibidora de PAI-1 y restauraría la producción de plasmina aguas abajo, siendo de ese modo una sustancia terapéutica eficaz para el tratamiento de la fibrosis renal, hepática o pulmonar, o la prevención de la formación de adherencias abdominales y la formación de cicatrices queloides. Se ha descrito que la neutralización de la función inhibidora de PAI-1 por anticuerpos monoclonales se divide en tres mecanismos: (1) bloqueo de PAI-1 a tPA o uPA por impedimento estérico, (2) conversión de PAI-1 en una conformación latente, o (3) conversión de PAI-1 en una conformación de sustrato.

#### a) Antígenos

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

El PAI-1 glicosilado humano producido en células de insecto se adquirió de Innovative Research (nº de Cat. IGLYHPAI-A). Vitronectina (nº de Cat. IHVN) y tPA (nº de Cat. HTPA-TC) también se adquirieron de Innovative Research. Para producir inmunógenos, PAI-1 se incubó con vitronectina en una relación molar 1:1 durante 1 hora a temperatura ambiente, o con tPA en una relación molar 1:1 durante 15 minutos a 37°C. Todos los inmunógenos se prepararon usando disolución salina estéril como diluyente.

#### b) Inmunizaciones

Se implementaron protocolos estándar de producción de hibridomas conocidos en la técnica para producir anticuerpos. Los enfoques estándar descritos previamente en la bibliografía usaron PAI-1 solamente o complejo de PAI-1/tPA. En cambio, los inventores generaron anticuerpos contra la conformación activa de PAI-1. El complejo de PAI-1/vitronectina se usó como un enfoque novedoso para generar anticuerpos contra PAI-1. Se tomó una estrategia de tres puntas, resumida a continuación, para generar anticuerpos:

(1) inmunización clásica de ratones con complejo de PAI-1/vitronectina para obtener esplenocitos de ratón para fusión con la línea celular de mieloma de ratón como una pareja de fusión para producir hibridoma;

(2) inmunización clásica de ratones con complejo de PAI-1/tPA para obtener esplenocitos de ratón para fusión con línea celular de mieloma de ratón como una pareja de fusión para producir hibridoma; y

(3) inmunización clásica de ratones con PAI-1 solo para obtener esplenocitos de ratón para fusión con línea celular de mieloma de ratón como una pareja de fusión para producir hibridoma.

Se usaron tres ratones por antígeno (PAI-1 solo, complejo de Vn/PAI-1, complejo de tPA/PAI-1) en el estudio. Los ratones eran ratones BALB/c hembra sin tratamiento previo de 9-20 semanas de edad (Charles River, código de raza 028). El día 0, se inmunizaron nueve ratones intraperitonealmente con PAI-1 solo, complejos de Vn/PAI-1 o tPA/PAI-1 en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se mezcló un total de 10 µg de antígeno por ratón a una relación 1:1 volumen de of Sigma Adjuvant System (nº de cat. de Sigma #6322) en un volumen total de 200 µl por ratón. El día 14, los ratones se estimularon con la misma cantidad de antígeno y se prepararon de la misma manera que el día 0. El día 21, se recogieron muestras de sangre para la evaluación del título de anticuerpos específicos de PAI-1. Los ratones inmunizados con complejos de PAI-1/tPA mostraron una reactividad específica muy baja contra PAI-1 y títulos altos de anti-tPA, y no se usaron para fusiones posteriores.

- En el día 51, el ratón con el título de anticuerpo específico anti-PAI-1 más alto y el título más bajo contra la proteína con la que se complejó el PAI-1 (es decir, Vn o tPA) mientras que aquellos que tienen el título más alto contra ortólogos de PAI-1 de ratón y de rata se seleccionaron para fusión. Los ratones seleccionados para la fusión se revacunaron con PAI-1 solamente o con complejo de PAI-1/Vn en PBS como un antígeno total de 10 ug por ratón mezclado a una relación 1:1 del Sigma Adjuvant System (nº de cat. de Sigma #6322) en un volumen total de 200 µl por ratón como se describe anteriormente. En el día 55, los ratones fueron sacrificados mediante cámara de CO<sub>2</sub>, se recogió sangre a través de la punción cardíaca, y se recogió el bazo para la producción de hibridomas. Los otros cuatro ratones se sometieron al mismo procedimiento en momentos posteriores (2-4 meses después de que se usó el primer ratón para la fusión).
- Las titulaciones séricas se realizaron en tres ratones para PAI-1 solamente y PAI-1/tPA, y en dos ratones para PAI-1/Vn, usando el protocolo de ELISA descrito en el Ejemplo 2 (ELISA de unión).

Tabla 3: Títulos séricos para ratones inmunizados con PAI-1, PAI-1/Vn o PAI-1/tPA

Inmunógeno	Título sérico frente a PAI-1 (OD <sub>405</sub> )			
	Ratón #	OD 1:100	OD 1:1000	OD 1:10000
PAI-1	1	2,1	1,9	1
PAI-1	2	2,1	1,4	1
PAI-1	3	2,0	1,4	1
PAI-1/Vn	2	2,15	1,5	1
PAI-1/Vn	3	1,7	1,25	1
PAI-1/tPA	1	1,2	0,8	0,3
PAI-1/tPA	2	1,3	0,9	0,7
PAI-1/tPA	3	1,3	0,9	0,5
NMS	n/a	0,4	0,12	0,07
NMS= suero normal de ratón; n/a=no aplicable				
OD <sub>405</sub> usando un instrumento BioTek Synergy HT				

- Los ratones inmunizados con el complejo PAI-1/tPA no alcanzaron criterios de títulos específicos altos, y no se usaron para fusiones (Tabla 3). En base a los títulos séricos presentados en la Tabla 3, se seleccionó para fusiones un total de 5 ratones con alto título específico contra PAI-1.

## b) Fusiones

- Los cinco ratones que tenían el título específico más alto contra PAI-1 se seleccionaron para fusiones. El día de la fusión, los ratones se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub>, se recogió sangre mediante punción cardíaca, y se extrajeron los bazos y se colocaron en una placa de Petri que contenía 10 ml de medio de fusión de hibridoma libre de suero (IMDM; medio de Dulbecco modificado de Iscove 500 ml (HyClone SH30259.01). Los esplenocitos se extrajeron del recubrimiento fibroelástico con unas pinzas y se lavaron dos veces en 10 ml de IMDM libre de suero (incluyendo el centrifugado inicial).

- Las células se contaron en un contador de células automatizado Countess. Las células de la pareja de fusión (mieloma: FO (ATCC ref CRL-1646)) y los esplenocitos se combinaron entonces en un tubo de 50 ml en una relación de 1:2 a 1:10 (por número de células) y se centrifugaron a 970 rpm durante 10 minutos (centrifugación lenta) para formar un pelete suelto. Al pelete celular se añadió gota a gota 1 ml de PEG precalentado (a 37°C) (PEG 1500 en 75 mM de Hepes 50% p/v, nº de cat de Roche 783641 (10783641001) a lo largo de un período de tiempo de 1 minuto, y las células se mezclaron después de que se añadió cada gota de PEG. El pelete se incubó con PEG durante 1 minuto más seguido de la adición de 10 ml de medio IMDM libre de suero durante 1 minuto, de modo que el primer 1 ml de 10 se añadió durante 30 segundos. Las células se sometieron a centrifugado lento a 970 rpm durante 10 minutos para preservar la viabilidad. Las células fusionadas se sembraron en placas de 96 pocillos a 200 µl en medio de selección (200 ml de Gibco Hybridoma (SFM # 12045), 20 ml de HyClone SuperLow IgG Defined FBS al 10% (# SH30898.03), 2 ml de penicilina/estreptomicina, 4 ml (Suplemento de Fusión y Clonación de Hibridomas (Roche Diagnostics 11 363 735 001 (50X)) y 4 ml de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) (Sigma-

Aldrich # HO262 (50X)). Las fusiones estaban listas para el cribado alrededor de 10 a 14 días después, o cuando el medio en los pocillos se volvió amarillo. Los sobrenadantes de los hibridomas desarrollados se analizaron entonces mediante ELISA (Ejemplo 2) para determinar la presencia de anticuerpos que se unen a PAI-1 y complejos de PAI-1/Vn.

## 5 Ejemplo 2: ELISA de unión para cribado de sobrenadante de hibridoma para determinar la especificidad por el complejo de PAI-1 - Vitronectina

Cada fusión de los bazos de los cinco ratones seleccionados dio como resultado alrededor de 5000 clones que debían seleccionarse para su unión al complejo PAI-1/Vn como un cribado primario de primera etapa. El cribado primario de los sobrenadantes de hibridoma se realizó en paralelo usando ELISA frente a PAI-1 o complejos de PAI-1-Vitronectina para seleccionar hibridomas que se unen específicamente a PAI-1 complejoado a Vitronectina. Los materiales usados para el ELISA fueron los siguientes: placas de ELISA Immulon 4 HBX (nº de cat de Dynax N0541216); Vitronectina monomérica humana a 5 ug/ml (nº de cat de Innovative Research IHVN); PAI-1 humano glicosilado (forma activa) (nº de cat de Molecular Innovations GLYHPAI-A); PAI-1 de ratón no glicosilado en algunas fusiones (nº de cat de Molecular Innovations MPAL-A); un anticuerpo secundario que era anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs # 115-035-166); y sustrato ABTS: Roche Diagnostics (# 11 204 521 001).

Los anticuerpos de control usados fueron:

- a) 33B8, un anticuerpo inhibidor monoclonal de ratón contra PAI-1 (IgG1; nº de cat de Innovative Research IMA-33B8);
- 20 b) 33H1, un anticuerpo inhibidor monoclonal de ratón contra PAI-1 (IgG1; nº de cat de Innovative Research IMA-33H1);
- c) 31C9, un anticuerpo no inhibidor monoclonal de ratón contra PAI-1 (IgG1; nº de cat de Innovative Research IMA-31C9); y
- 25 d) 1B7.11, un anticuerpo de control de isotipo IgG1 (mAb anti-TNP - producido en nuestro laboratorio a partir de la línea celular de hibridoma adquirida de ATCC (nº de Cat TIB-191))

El método de ELISA fue como sigue: se recubrieron placas con 5 ug/ml de Vn en PBS toda la noche a 4°C, a 50 ul/pocillo; al día siguiente, las placas se bloquearon 1 hora con 200 ul de seroalbúmina bovina al 1% en PBS (BSA/PBS); las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS; se añadió PAI-1 activo, a 2 ug/ml en 1% de BSA/PBS, a las placas, a 50 ul/pocillo, y se incubó durante 1 hora; las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS; a las placas de ELISA, se añadieron, a 50 ul/pocillo, diluciones de anticuerpos en 1% de BSA/PBS o sobrenadantes de hibridoma procedentes de las placas originales de 96 pocillos; las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente (RT); las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS; se añadió anti-IgG de ratón conjugado con HRP, 50 ul 1:2000 en 1% de BSA/PBS, y se incubó 1 hora a temperatura ambiente; las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS; se añadió a las placas sustrato ABTS (una pastilla disuelta en 5 ml), a 50 ul/pocillo, y entonces las placas se leyeron en el instrumento BioTek Synergy HT usando OD<sub>405</sub>. En la Figura 2 se muestra una curva estándar típica para la titulación de anticuerpos en el ELISA de unión. Los anticuerpos 31C9, 33B8 y 33H1 sirvieron como controles positivos, e IgG1 sirvió como control negativo. La Tabla 4 muestra que de los alrededor de 5000 clones generados, 675 clones fueron positivos para la unión tanto a PAI-1 como a PAI-1/Vn. Estos clones se cribaron entonces para determinar la afinidad por PAI-1.

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

Fusión	Inmunógeno	Ratón #	# de clones positivos para la union tanto a PAI-1 como a PAI-1/Vn
A	PAI-1/Vn	2	131
B	PAI-1	2	146
C	PAI-1/Vn	3	145
D	PAI-1	3	104
E	PAI-1	1	149

**Ejemplo 3: Cribado de Biacore de sobrenadantes de hibridomas mediante clasificación de la afinidad**

Se llevó a cabo una selección posterior de un anticuerpo de alta afinidad con baja constante de disociación mediante Biacore. El cribado de Biacore de los sobrenadantes de hibridomas se llevó a cabo: (1) cribando de forma inversa usando anticuerpos anti-PAI-1 inmovilizados anti-ratón, o (2) mediante ensayo de cribado directo usando PAI-1 libre como ligando, o contra Vn inmovilizada.

Los instrumentos usados fueron el BIACORE 2000 o BIACORE 3000 (GE Healthcare), diseñados para el análisis de interacción biomolecular (BIA) en tiempo real. El chip sensor usado fue el chip CM5 (GE Healthcare), con una matriz de dextrano carboximetilado sobre la superficie. Cada chip sensor tiene cuatro celdas de flujo paralelas (Fc). Cada celda de flujo se acopló con mAb anti-Fc de IgG de ratón vía acoplamiento amínico estándar según el protocolo del fabricante para la preparación del chip.

En el ensayo de cribado inverso de Biacore, los sobrenadantes de hibridomas positivos para ELISA se seleccionaron y se filtraron a través de filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  antes de inyectarlos sobre la superficie del chip de Biacore. Cada sobrenadante de hibridoma se inyectó sobre una celda de flujo de celdas de flujo Fc2-Fc4, y la IgG en el sobrenadante de hibridoma se capturaría a la superficie del chip mediante mAb anti-Fc de IgG de ratón, mientras que Fc1 se dejó solo como células de referencia. Entonces se inyectó la proteína PAI-1 humana en PBS a Fc1 a Fc4. También se inyectó el amortiguador de PBS sobre la superficie del chip, como un blanco. Tras restar las señales de los experimentos de Fc1 y del amortiguador del blanco, se analizó la afinidad de unión (KD)/velocidad de disociación (kd) del anticuerpo procedente de los sobrenadantes a la proteína PAI-1, y se clasificó usando el software Scrubber 2.

En el ensayo de cribado directo de Biacore, la proteína vitronectina humana purificada se inmovilizó a las celdas de flujo Fc1 a Fc4 del chip CM5. PAI-1 humano o de macaco se capturó sobre todas las celdas de flujo. Los sobrenadantes de hibridomas seleccionados filtrados se inyectaron entonces sobre PAI-1 capturado, uno por celda de flujo, excepto Fc1, que se reservó como la celda de flujo de referencia. También se inyectó el amortiguador de PBS sobre la superficie del chip como un blanco. Tras restar las señales de los experimentos de Fc1 y del amortiguador del blanco, se analizó la afinidad de unión del anticuerpo en el sobrenadante de hibridoma por PAI-1 capturado con vitronectina, y se clasificó usando el software Scrubber 2 (versión 2.0a, 2005; BioLogic Software, BioLogic Software Pty Ltd., 116 Blamey Court, Campbell, ACT 2612 Australia).

La Tabla 5 muestra una selección de clones de anticuerpos positivos y negativos procedentes de las fusiones A, B, C, D y E. No se mostraron todos los datos debido al gran número de clones de anticuerpos que se cribó. Solamente se seleccionaron para el ensayo cromogénico funcional los clones de anticuerpos que demostraron una velocidad de disociación de unión superior ( $\text{kd} < 10^{-4} \text{ 1/s}$ ) contra las proteínas PAI-1 humana y de macaco.

Tabla 5: Unión de los sobrenadantes de hibridomas a PAI-1 humano  
Cribado de la afinidad/disociación en el ensayo de Biacore

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

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

“+” = representa union positiva a h/cPAI-1 o una velocidad de disociación menor o igual  $10^{-4}$

“+/-” = representa union parcial a h/cPAI-1 o una velocidad de disociación ligeramente mayor que  $10^{-4}$

“-” = representa poca o ninguna unión a h/cPAI-1 o una velocidad de disociación mayor que  $10^{-4}$

ND = no determinado

#### Ejemplo 4: ELISA funcional para el cribado de sobrenadantes de hibridomas para seleccionar anticuerpos que bloquean la interacción de PAI-1 con tPA

- 5 Para permitir la selección de anticuerpos funcionales, se desarrolló un nuevo ELISA para permitir la distinción entre anticuerpos que se unen solamente a PAI-1 frente a aquellos anticuerpos que bloquearon la función de los PAI-1 como inhibidor de tPA (ELISA funcional).

- 10 Los sobrenadantes de hibridomas se cribaron en un nuevo ELISA funcional para identificar el sobrenadante de hibridoma a partir de diferentes clones que tienen la capacidad para bloquear la interacción tPA-PAI-1. El diseño del ELISA funcional es como sigue: (1) si el anticuerpo se une a PAI-1 pero la unión del anticuerpo no bloquea la formación del enlace covalente entre PAI-1 y tPA, el anticuerpo anti-tPA se unirá al tPA que está unido a la placa a través de PAI-1, y da una lectura positiva; (2) si el anticuerpo bloquea PAI-1, y de ese modo bloquea la interacción de tPA cambiando la conformación de PAI-1 o mediante impedimento estérico, el anticuerpo anti-tPA no será capaz de unirse a la placa, y la lectura será negativa ( $OD_{405}$  más baja). En paralelo, los sobrenadantes de hibridomas se evaluaron para determinar la unión a PAI-1 en el ELISA descrito en el Ejemplo 2. Puesto que se desconoce la
- 15 cantidad de anticuerpo en el sobrenadante de hibridoma, una lectura más baja que el control (es decir, por debajo de la lectura de control de isotipo) se consideró que identifica un anticuerpo de interés. Debido a la concentración variable de anticuerpo en el sobrenadante, el bloqueo en algunos casos fue solamente parcial.

- Se incubaron placas recubiertas de estreptavidina (NUNC # 436014) durante 2 horas a RT con 2 ug/ml de biotina-PAI-1 (PAI-1 humano que tiene una fracción activa marcada con biotina N-terminal; n° de cat de Molecular Innovations NTBIOPAI-A) en 1% de BSA/PBS a 50 ul/ml. Las placas se bloquearon 1 hora con 200 ul de 1% de BSA/PBS a RT, y se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Las diluciones de anticuerpos purificados y los sobrenadantes de hibridomas se añadieron a los pocillos a 50 ul/pocillo, y se incubaron durante 15 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Se añadió a las placas, a 50 ul/pocillo, tPA bicatenario (n° de cat de Innovative Research HTPA-TC) a 1 ug/ml, y se incubó durante 30 minutos a RT. Las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Se añadió a las placas anticuerpo anti-tPA conjugado con HRP (Life Span Technologies, n° de cat LS-C39721) a una dilución de 1:3000, y se incubó durante 45 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces con 200 ul/pocillo de PBS. Se añadió a las placas sustrato ABTS (un comprimido disuelto en 5 ml; Roche Diagnostics # 11 204 521 001), a 50 ul/pocillo, y se dejó tiempo para que se desarrollase el color. Las placas se leyeron en el instrumento BioTek Synergy HT, usando OD<sub>405</sub>. Las ODs con los valores que son menores que el control de isotipo IgG indican bloqueo de la unión de tPA a PAI-1.
- En algunos casos, el ELISA funcional se llevó a cabo antes del cribado de los sobrenadantes de Biacore, y sirvió como una etapa de selección que fue más importante para el desarrollo de hibridomas. En la Figura 3 se muestra una curva representativa con 33H1 como control positivo, IgG1 como control negativo, y A44 como un clon de anticuerpo positivo identificado.

Tabla 6: ELISA funcional para el cribado de sobrenadantes de hibridomas para seleccionar anticuerpos que bloquean la interacción de PAI-1 con tPA

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

<b>B28</b>	+	+/-	sí	<b>D47</b>	+	+	sí
<b>B29</b>	+	+	sí	<b>D48</b>	+	+	sí
<b>B32</b>	+	+	sí	<b>D52</b>	+	+	sí
<b>B58</b>	+	+	sí	<b>D55</b>	+	+	sí
<b>B85</b>	+	-	no	<b>E4</b>	+	-	no
<b>B89</b>	+	+	sí	<b>E5</b>	+	-	no
<b>B99</b>	+	+	sí	<b>E11</b>	+	+	sí
<b>B105</b>	+	+	sí	<b>E16</b>	+	+	sí
<b>B109</b>	+	+	sí	<b>E20</b>	+	-	no
<b>B118</b>	+	+	sí	<b>E21</b>	+	+	sí

PAI-1 ELISA = una "+" representa la unión a PAI-1 (véase el Ejemplo 2)

Inhibición de la unión tPA/PAI-1 = una puntuación "+" representa que la interacción de tPA con PAI-1 está inhibida;

+/- = inhibición parcial de la interacción de tPA con PAI-1

Se cribaron alrededor de 200 sobrenadantes. La Tabla 6 muestra una selección de sobrenadantes de hibridomas positivos y negativos. Alrededor de 10 hibridomas por fusión mostraron la capacidad de bloquear PAI-1 de la unión a tPA en el ELISA funcional. En base a los datos procedentes de los sobrenadantes de hibridomas, se seleccionaron hibridomas para la secuenciación y la producción de anticuerpos a escala media. Incluso aunque D4 no se unió bien a PAI-1 no glicosilado, se seleccionó para la purificación y secuenciación en base a su unión de Biacore a PAI-1 glicosilado. Los anticuerpos purificados se caracterizaron además en Biacore para determinar la cinética de afinidad, y en ensayos cromogénicos y celulares para determinar la potencia en comparación con los anticuerpos comercialmente disponibles.

#### **Ejemplo 5: Secuenciación mediante 5'-RACE (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc), y purificación de anticuerpos de ratón**

Los anticuerpos para una diana específica generados a partir de una serie de fusiones podrían tener las mismas secuencias. Al llevar a cabo la secuenciación génica de los anticuerpos en una etapa temprana de la generación de los anticuerpos, se eliminaron cualesquiera anticuerpos posiblemente redundantes, y las secuencias génicas de los anticuerpos correctas guiaron la selección y humanización de los anticuerpos así como la construcción de anticuerpos quiméricos.

5'-RACE es un procedimiento para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos a partir de un molde de ARN mensajero entre un sitio interno definido y secuencias desconocidas en el extremo 3' o 5' del ARNm. Esta metodología de amplificación con especificidad de un solo lado se ha descrito como PCR "de un lado" o PCR "anclada". La secuencia de anticuerpo murino variable original anti-PAI-1 humano del anticuerpo primario se determinó mediante secuenciación de ADNc por 5'-RACE, y se confirmó mediante secuenciación de proteína N-terminal.

Para determinar las secuencias de IgG de cadena variable pesada (VH) y de cadena ligera (VL), se aisló ARN total de las células de hibridoma usando RNeasy Mini Kit (QIAGEN, nº de Cat 74104) según las instrucciones del fabricante. De forma breve, las células (5 x 10<sup>6</sup> células) se lisaron en 350 µl del amortiguador RLT del kit, seguido de la captura de los ARN total en la columna de centrifugación. El ARN se eluyó en el amortiguador TE del kit, y se almacenó en hielo.

Se preparó ADNc de primera hebra usando el kit de amplificación de ADNc mediante RACE SMARTer™ (ClonTech, nº de Cat 634923). El protocolo de 5'-RACE se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Los ADNc de cadena VH y VL se amplificaron por separado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores de 5' suministrados con el kit SMARTer™ y los cebadores específicos de los genes de 3' VH y VL enunciados a continuación:

Cadena pesada 3'-cebador: 5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA-3' (SEQ ID NO: 105)

Cadena ligera 3'-cebador: 5'-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAG-3' (SEQ ID NO: 106)

Los genes amplificados de VH y VL se clonaron por separado en el vector TOPO usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, nº de Cat K4520-01). Los procedimientos se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. Para transformar bacterias, se añadieron mezclas de reacción a células de *E. coli* competentes, y se incubó en hielo durante 20 minutos. Los tubos, que contenían las células de *E. coli* y la mezcla de reacción, se calentaron a 42°C durante 40 segundos, y se les añadieron 250 microlitros de medio SOC de la bibliografía. Tras incubar la *E. coli* a 37°C durante 60 minutos con agitación a 300 rpm, las bacterias se extendieron sobre placa de LB agar, que contiene 100 microgramos por ml de ampicilina, seguido de la incubación a 37°C, toda la noche.

Con la confirmación mediante PCR del gen VH y VL insertado, se seleccionaron cinco clones bacterianos, y se propagaron en caldo LB que contiene 100 microgramos por ml de ampicilina, para la preparación de ADN plasmídico. Los ADN plasmídicos se aislaron usando el QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, nº de Cat 27104) según las instrucciones del fabricante. Los genes de IgG de VH y VL de los hibridomas se secuenciaron mediante el método de Sanger, y las CDRs se determinaron usando la definición de Contacto (MacCallum et al.).

Se produjeron anticuerpos monoclonales en matraces de biorreactor CELLline (Wilson Wolf Manufacturing Corp.; nº de Cat. CL350 o nº de Cat CL1000), según las instrucciones del fabricante en medio libre de suero (nº de Cat. de Gibco 12045), y se purificaron mediante cromatografía de proteína A/G (GE Healthcare Life Sciences, nº de Cat. 28-4083-47 y nº 28-4082-53). Los anticuerpos purificados se caracterizaron adicionalmente en Biacore para determinar la cinética de afinidad, y en ensayos cromogénicos y celulares para determinar la potencia en comparación con los anticuerpos comercialmente disponibles.

#### **Ejemplo 6: Ensayo cromogénico funcional que usa anticuerpo purificado**

Los anticuerpos purificados se estudiaron en un ensayo cromogénico para determinar la capacidad para bloquear PAI-1. PAI-1 inhibe la función de tPA; por lo tanto, los anticuerpos que bloquean PAI-1 darán como resultado la restauración de la función de tPA. Los ensayos cromogénicos usan enzimas proteolíticas que actúan sobre sus sustratos naturales (proteínas y péptidos) hidrolizando uno o más enlaces peptídicos. Este proceso es habitualmente muy específico en el sentido de que solamente se escinden los enlaces peptídicos adyacentes a ciertos aminoácidos. Los sustratos cromogénicos son péptidos que reaccionan con enzimas proteolíticas que dan como resultado la formación de color, que es cuantificable. Los sustratos cromogénicos se obtienen sintéticamente, y se diseñan para que posean selectividad similar a la del sustrato natural para la enzima. Unido a la parte peptídica del sustrato cromogénico hay un grupo químico que, cuando se libera tras la escisión enzimática, da lugar a color. El cambio de color puede seguirse espectrofotométricamente, y es proporcional a la actividad proteolítica.

Se usó un ensayo cromogénico para confirmar la capacidad del anticuerpo para neutralizar la función de PAI-1 como un inhibidor de tPA. tPA es capaz de liberar pNA a partir del sustrato cromogénico S2288. En disolución, S228 no tiene color, pero tras exponerlo a tPA y la liberación subsiguiente de pNA, la disolución desarrolla un color amarillo que se puede leer a OD<sub>405</sub>. La formación de color se puede observar a lo largo de 2-3 horas para determinar la cinética de la reacción enzimática. PAI-1 es capaz de bloquear la actividad enzimática de tPA de una manera dependiente de la concentración.

Se llevó a cabo un ensayo cromogénico de dos etapas. Todos los reactivos tienen una concentración 10x hasta la etapa cuando se añaden a la disolución de sustrato. En la primera etapa, la potencia de PAI-1 en la inhibición de tPA se midió usando el ensayo cromogénico (titulación de PAI-1 con concentración fija de tPA). La curva de valoración de PAI-1 se analizó para determinar la IC<sub>50</sub> para PAI-1 que bloquea la actividad de tPA. Después, la IC<sub>80</sub> calculada a partir de la curva se seleccionó para la interrogación adicional del anticuerpo para determinar la capacidad para neutralizar la función de bloqueo de PAI-1 y restaurar la actividad enzimática de tPA. Se combinaron volúmenes iguales (25 µl) de tPA (a 14 nM) (Innovative Research, nº de Cat. IHTPA-TC) y PAI-1 humano (forma activa) glicosilado (Molecular Innovations, nº de Cat. GLYHPAI-A) o PAI-1 de ratón (forma activa) no glicosilado (Molecular Innovations nº de Cat. IMPAI), y se incubaron usando diluciones en serie de 3 veces de PAI-1, partiendo de 108 nM y concentración fija de tPA. Todas las diluciones de proteínas se realizaron con 1% de BSA/PBS. La mezcla se incubó en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron a los pocillos 200 µl de sustrato cromogénico S2288 (1,25 mM) (Chromogenix, nº de Cat. S-820852) diluido según las instrucciones del fabricante, y se registró el cambio de absorbancia de OD<sub>405</sub> a 405 nm a lo largo de 2 horas cada 10 minutos, para medir la actividad residual de tPA. Para los controles, el fondo se midió en ausencia de tPA (reacción no enzimática), un control positivo no fue PAI-1 (actividad de tPA de 100%), y un control negativo fue PAI-1 en un exceso de 10 veces de tPA (bloqueo completo de la actividad de tPA). Véase la Figura 4 para las curvas representativas para 33B8, A44, 33H1 e IgG1.

Para la segunda etapa, las propiedades funcionales de los anticuerpos se determinaron evaluando su capacidad para inhibir PAI-1 activo y restaurar la función de tPA usando el ensayo de neutralización de PAI-1. Para esta etapa, se incubó PAI-1 activo 12,5 µl (a 56 nM) con un volumen igual de PBS (Invitrogen, nº de Cat. 14190-144) que contiene 1% de BSA (Sigma, nº de Cat. A3059), o con diluciones en serie de 3 veces de anticuerpo, partiendo de 2 µM. Los anticuerpos de control y desconocidos se incubaron a concentraciones (diluciones de 5 veces) que oscilan desde 0,1 a 300 nM con 3 nM de PAI-1, y se añadió tPA a la mezcla. Todos los ingredientes se incubaron a una concentración 10x a temperatura ambiente, y se diluyeron posteriormente 10 veces con sustrato S2288 de tPA que, con la escisión mediante tPA, cambia de color desde transparente a amarillo. Las muestras se leyeron a OD 405

durante 2 horas cada 10 minutos a 37°C. La mezcla se dejó reaccionar en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente, para lograr la formación del complejo anticuerpo-antígeno. Después, se añadieron a los pocillos 25 µl de tPA (a 14 nM, que corresponde a una inhibición de IC<sub>50</sub> de la actividad de tPA), y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron a la mezcla 200 µl de sustrato S2288 1,25 mM, diluido según las instrucciones del fabricante. El cambio de absorbancia a 405 nm se registra para medir la actividad de tPA residual durante 2 horas cada 10 minutos. Una actividad de PAI-1 de cien por ciento se define como la actividad PAI-1 observada en ausencia de anticuerpo. La neutralización de la actividad de PAI-1 por el anticuerpo se calcula a partir de la actividad de PAI-1 residual medida en presencia del anticuerpo. Los controles fueron IgG1 como un control de isotipo (negativo), y mAb 33H1 y mAb 33B8 como controles positivos. Véase la Figura 5 para curvas representativas para B28, E16, E21, A75 e IgG1.

Se evaluaron ortólogos de PAI-1 humano que inhibe tPA humano, en el sistema de ensayo cromogénico de dos etapas. La titulación de ortólogos se llevó a cabo como se describe anteriormente para PAI-1 humano (véase la Figura 6 para curvas representativas de titulaciones), y la actividad de tPA se determinó mediante método cromogénico (véase la Figura 7 para curvas representativas para 33B8 y A44 contra PAI-1 de macaco y de ratón). La concentración final de tPA humano usada en el ensayo fue 1,4 nM. Se incubaron 12,5 µl de PAI-1 activo (56 nM) con un volumen igual de PBS que contiene 1% de BSA, o con diluciones en serie de 3 veces de anticuerpo, partiendo de 2 µM. La mezcla se dejó reaccionar en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron a los pocillos 25 µl de tPA (14 nM), y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar la reacción, se añadieron a la mezcla 200 µl de sustrato S2288 de tPA (Chromogenix) (1,25 mM). Se obtuvo PAI-1 ortólogo de Molecular Innovations: PAI-1 de ratón (fracción activa de tipo salvaje; nº de cat MPAL); PAI-1 de rata (fracción activa de tipo salvaje; nº de cat RPAI); y PAI-1 de conejo (mutante estable; nº de cat RbPAI-I91L); PAI-1 de macaco (PAI-1 de macaco activo) se produjo en nuestro laboratorio en E. coli. Debido a las malas velocidades de disociación de los ortólogos de conejo y de rata en el cribado de Biacore (datos no mostrados), no se llevó a cabo el cribado de los anticuerpos contra estos ortólogos.

Tabla 7: Actividad de los anticuerpos contra ortólogos, y estados de glicosilación de PAI-1 en ensayo cromogénico funcional

Clon ID	Isotipo	Ortólogo de PAI-1 y estado de glicosilación			
		hPAI-1 no glicosilado	hPAI-1 glicosilado	cPAI-1 no glicosilado	mPAI-1 no glicosilado
A37	IgG1	+/-	-	-	-
A39	IgG1	-	+++	-	-
A41	IgG1	+/-	-	-	-
A44	IgG1	+++	+++	+++	-
A47	IgG1	nd	-	-	-
A71	IgG1	+++	+++	+++	-
A75	IgG2a	+++	+++	+++	-
A83	IgG1	nd	+/-	+/-	-
A89	IgG2b	-	-	-	-
A98	IgG1	nd	nd	nd	nd
A105	IgG1	+++	+++	+++	-
A107	IgG1	+/-	-	-	-
A113	IgG1	-	-	-	-
A119	IgG2a	-	-	-	-
B18	IgG1	+	+	+	-
B28	IgG2b	-	+++	-	-
B29	IgG1	-	-	-	-

<b>B32</b>	IgG1	nd	-	-	-
<b>B58</b>	IgG1	nd	+	+	-
<b>B89</b>	IgG1	nd	-	-	-
<b>B99</b>	IgG2a	nd	+	+	-
<b>B105</b>	IgG1	-	-	-	-
<b>B109</b>	IgG1	+++	+++	+++	-
<b>B118</b>	IgG1	+	+	+	-
<b>C26</b>	IgG1	++	++	++	+
<b>C45</b>	IgG2b	+++	+++	+++	-
<b>C61</b>	IgG1	+	+	+	-
<b>C66</b>	IgG1	+	+	+	-
<b>C69</b>	IgG1	++	++	++	-
<b>C79</b>	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
<b>C109</b>	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
<b>C118</b>	IgG1	++	++	++	-
<b>C145</b>	IgG2b	++	++	++	-
<b>D4</b>	IgG2a	+	++	+	-
<b>D12</b>	IgG1	+	+	+	-
<b>D13</b>	IgG1	-	-	-	-
<b>D15</b>	IgG1	+	+	+	-
<b>D31</b>	IgG1	++	++	++	-
<b>D33</b>	IgG1	-	-	-	-
<b>D37</b>	IgG2a	-	-	-	-
<b>D48</b>	IgG2a	-	+/-	-	-
<b>D52</b>	IgG1	+	+	+	-
<b>E11</b>	IgG1	++	++	++	-
<b>E16</b>	IgG1	+++	+++	+++	-
<b>E21</b>	IgG2b	+++	+++	+++	-

h = humano, c = mono macaco, m = ratón, nd = no determinado

"-" = sin actividad, "+/-" = actividad parcial "+" = ligera actividad, "++" = actividad moderada, "+++ = fuerte actividad

5 Uno o más anticuerpos procedentes de cada fusión demostraron la capacidad de bloquear la función inhibidora de PAI-1 tanto de macaco como de humano en este ensayo, teniendo alrededor de 14 anticuerpos una actividad de bloqueo moderada a fuerte. A39 y B28 tuvieron un perfil único por cuanto estos dos anticuerpos bloquearon hPAI-1 glicosilado, pero no tuvieron actividad contra PAI-1 no glicosilado humano o de macaco. Ninguno de los anticuerpos fue capaz de bloquear eficientemente la actividad de PAI-1 de ratón (dentro de 10 veces del PAI-1 humano), excepto C26.

**Ejemplo 7: Mecanismo de acción para anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales pueden inhibir PAI-1 mediante tres mecanismos diferentes: a) mediante impedimento estérico, b) convirtiendo PAI-1 en una conformación latente con la unión, y c) convirtiendo PAI-1 en un sustrato para la conformación de tPA en lugar del inhibidor ("conformación de sustrato"). PAI-1 forma un enlace covalente con tPA al interactuar con serina proteasa.

El ensayo cromogénico y las técnicas de SDS-PAGE se usaron para identificar el mecanismo de acción de los anticuerpos. Se llevó a cabo una reacción entre el anticuerpo monoclonal (o anticuerpos de control), PAI-1 y tPA como se describe anteriormente para el ensayo cromogénico funcional. Las muestras se mezclaron con amortiguador de muestras de Laemmli, y se cargaron en gel de SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y se hicieron pasar durante 30 minutos. Después, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para visualizar las proteínas, los complejos y la forma escindida de PAI-1. Como comparadores, se usaron anticuerpos monoclonales de control con mecanismo de acción conocido. Se sabe que 33B8 convierte PAI-1 en una conformación latente, y se sabe que 33H1 convierte PAI-1 en una conformación de sustrato. Este ensayo pudo identificar de forma positiva la conformación de sustrato, pero fue incapaz de distinguir entre la conformación latente o el impedimento estérico. En las Figuras 8, 9 y 10 se muestran los geles de SDS representativos.

Tabla 8: Mecanismo de acción de anticuerpos monoclonales

Anticuerpo	Mecanismo de acción
A44	Convierte PAI-1 de conformación activa → sustrato
C26	Convierte PAI-1 de conformación activa → sustrato
C45	Convierte PAI-1 de conformación activa → sustrato
E21	Convierte PAI-1 de conformación activa → sustrato
A39	Convierte PAI-1 de conformación activa → latente o impedimento estérico
B109	Convierte PAI-1 de conformación activa → latente o impedimento estérico
E16	Convierte PAI-1 de conformación activa → latente o impedimento estérico

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

**Ejemplo 8: Cinética de unión de anticuerpos purificados**

En la medida de la cinética, los anticuerpos se evaluaron de forma inversa a 25°C. En el ensayo inverso, los anticuerpos contra PAI-1 se capturaron a la superficie del anticuerpo anti-Fc de IgG de ratón preparada en el chip CM5, seguido de la inyección de las diluciones en serie 2x de proteínas PAI-1 (humana o de macaco), partiendo de 40 nM. Se escogió un caudal elevado de 50 µl/min para evitar la limitación del transporte de masas. Se permitieron doscientos segundos para el tiempo de disociación, para adecuarse a la velocidad de disociación lenta de los anticuerpos seleccionados. El chip se regeneró mediante amortiguador de glicina-HCl, pH 1,7, después de cada ronda de unión de anticuerpo-PAI-1. El análisis de los datos cinéticos se llevó a cabo usando el software de Biacore BIAevaluation. Los sensogramas se referenciaron doblemente restando los valores de la celda de flujo de referencia y los valores del amortiguador del blanco. Los sensogramas se ajustaron usando el modelo 1:1 de cinética simulada (Langmuir) con Rmax local. En la Tabla 9 se muestran a continuación los datos para los anticuerpos evaluados.

Tabla 9: Cinética de unión mediante ensayo inverso de Biacore

Anticuerpo	PAI-1 humano		PAI-1 de macaco	
	Velocidad de disociación kd (1/s)	Afinidad KD (M)	Velocidad de disociación kd (1/s)	Afinidad KD (M)
A39	7,09E-05	1,16E-11	ND	ND
A44	1,49E-05	3,76E-12	<= 1,0E-6	<=1,0E-13

<b>A75</b>	4,76E-04	1,20E-10	ND	ND
<b>A105</b>	1,64E-04	4,23E-11	ND	ND
<b>B28</b>	4,61E-04	6,5E-10	ND	ND
ND = no determinado				

La cinética de unión de los anticuerpos representativos se analizó adicionalmente y se comparó en el ensayo directo de Biacore con el complejo de vitronectina y PAI-1. En el ensayo directo, se inmovilizó la proteína de vitronectina humana sobre el chip CM5 en las celdas de flujo Fc1-Fc4 mediante acoplamiento amínico. Entonces se capturó PAI-1 humano a la superficie de vitronectina en las celdas de flujo Fc2-Fc4 como ligando. Fc1 se reservó como célula de referencia. Los anticuerpos se diluyeron 2x partiendo de 40 nM, y se inyectaron a Fc1-4. El análisis de los datos cinéticos se llevó a cabo usando el software de Biacore BIAevaluation. Los sensogramas se referenciaron doblemente en primer lugar restando los valores de las celdas de referencia y los valores del amortiguador del blanco, y ajustando entonces mediante el modelo 1:1 (Langmuir) con Rmax global.

Tabla 10: Cinética de la unión de A44 a PAI-1 humano capturado sobre vitronectina humana en el ensayo directo de Biacore

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

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

#### Ejemplo 9: Ensayo funcional en células humanas primarias

Para investigar adicionalmente la capacidad de cada anticuerpo para restaurar la producción de plasmina aguas abajo por células humanas primarias, se usó un ensayo de generación de plasmina. En este ensayo, solamente se usaron los anticuerpos que mostraron una potencia elevada en el ensayo cromogénico y una buena afinidad en Biacore.

En el día 1, células estrelladas hepáticas primarias humanas (Sciencell CA, nº de cat SC5300) se colocaron en placas a 20000 células/pocillo en medio de inanición (DMEM Gibco + glutamax-14,5 g/l de D-Glucosa, piruvato (31966-021), 0,2% Fetal Bovine Serum gold PAA (A11-152)) a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. En el día 2, para neutralizar la actividad de PAI-1, los anticuerpos se preincubaron con PAI-1 recombinante (Molecular Innovation, nº de cat IGLYHPAI-A, PAI-1 humano glicosilado recombinante, concentración final 5 nM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, tPA (Molecular Innovations (nº de cat HTPA-TC), 5 nM en DMEM sin rojo fenol) se incubó con células durante 15 minutos a 37°C. Tras lavar el tPA no unido, se añadieron en las células mezclas de PAI-1/mAb, y entonces se midió la actividad de tPA residual añadiendo una mezcla de glu-plasminógeno/sustrato (Glu-Pg: Sigma nº de cat 9001-91-6; concentración final 0,5 µM) y sustrato cromogénico de plasmina: (CBS00.65 Stago nº de cat 00128, concentración final 0,5 mM).

La activación de plasminógeno a plasmina se detecta mediante lectura cinética cada 45 segundos de A405/492 nm usando un espectrofotómetro (IEMS, Thermofisher) termostatzado a 37°C. El software Biolise (Thermofischer) calcula la tasa máxima de escisión del sustrato cromogénico: generación de plasmina expresado como Vmax: tasa máxima de A405/492 nm por min (mDO/min) calculada. Entonces se calcula la inhibición de PAI-1 con tPA solo como referencia (inhibición de 100%) y PAI-1 (sin mAb, como no inhibición), y se representa gráficamente usando el software Biostat speed para calcular, para calcular IC<sub>50</sub> e I<sub>max</sub>.

Tabla 11: Generación de plasminógeno en células estrelladas hepáticas primarias humanas

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> abs media ± sem (nM)	I <sub>max</sub> media (%)	n
A44	3,32 ± 0,34	97	7
A39	5,4 ± 0,8	99	3
A71	8,61 ± 3,6	90	3
A75	22,6 ± 8,2	66	4

A105	27± 7,8	88	3
B28	7,28 ± 2,7	90	3
B109	6,11 ±0,88	94	3
C26	Inactivo	n/a	2
C45	6,5±1,11	97	4
E16	4,74 ± 2,27	95	3
E21	Inactivo	n/a	3
33H1	22,92 ± 12	56	3
33B8	Inactivo	n/a	3
n/a = no aplicable			

#### Ejemplo 10: Exploración del epítipo que se une al anticuerpo mediante ensayo de competición de Biacore

Se exploró un grupo seleccionado de anticuerpos anti-PAI-1 con actividades de unión y bloqueo superiores en busca de sus epítipos de unión potenciales en los ensayos de competición de Biacore. En los ensayos, los anticuerpos recientemente identificados, así como varios anticuerpos anti-PAI-1 comercialmente disponibles con sitio de unión conocido en PAI-1 humano, se montaron para competir por la unión a la proteína PAI-1 humana. Cada anticuerpo se inmovilizó sobre una celda de flujo en chip CM5 de Biacore usando reacción de acoplamiento amínico estándar. Todos los anticuerpos ensayados, excepto el clon B28, retuvieron la actividad del sitio de unión tras el acoplamiento amínico. La proteína PAI-1 humana se capturó en el chip al anticuerpo inmovilizado, seguido de la inyección de cada anticuerpo como analito. Solamente los anticuerpos analitos que tienen sitios de unión diferentes en PAI-1 humano del anticuerpo inmovilizado mostrarán señales de unión adicionales en Biacore. Los experimentos de competición se repitieron dos veces para cada anticuerpo inmovilizado, y los resultados se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 12: Sumario de epítipos de unión del ensayo de competición de Biacore

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

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

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

De forma interesante, algunos anticuerpos inmovilizados (es decir, B109) bloquearon la unión del anticuerpo analito (es decir, 33B8) a la proteína PAI-1 capturada; pero, cuando se cambian las posiciones del anticuerpo inmovilizado al anticuerpo analito (por ejemplo, cambiando el par en el chip), el par de anticuerpos ya no compitieron por la unión entre sí a PAI-1. Por ejemplo, cuando B109 fue el anticuerpo inmovilizado unido a PAI-1, 33B8 fue incapaz de unirse a PAI-1. Sin embargo, cuando 33B8 fue el anticuerpo inmovilizado que se une a PAI-1, B109 fue capaz de unirse a PAI-1. Una posible explicación para este resultado es que cuando el anticuerpo inmovilizado está unido a PAI-1, PAI-1 puede desplazarse hacia una conformación desfavorable para el anticuerpo segundo o analito, y evita que se una el anticuerpo analito (por ejemplo, cuando B109 es el anticuerpo inmovilizado y 33B8 es el anticuerpo analito). Sin embargo, cuando se invierte el par de anticuerpos, el anticuerpo que se inmoviliza puede unirse de tal manera que la conformación de PAI-1 está relativamente sin cambios, permitiendo así que el anticuerpo analito se una al PAI-1 unido (es decir, el anticuerpo analito B109 es capaz de unirse a PAI-1 que está unido por el anticuerpo inmovilizado 33B8). Por lo tanto, la competición observada entre 33B8 y B109 no fue debida al solapamiento de los sitios de unión en PAI-1, sino probablemente debida a un cambio conformacional en PAI-1 cuando está unido a B109.

Otra observación interesante fue que B28 perdió la unión a PAI-1 humano cuando se inmovilizó vía acoplamiento amínico, sugiriendo que las regiones CDR de B28 implican aminoácidos con grupo o grupos amina primaria.

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

La Tabla 13 muestra un resumen de los datos *in vitro* que caracterizan los anticuerpos monoclonales más activos procedentes de las cinco fusiones realizadas. En base a estos datos, A44 se seleccionó para la humanización debido a que A44 fue el anticuerpo más potente en el ensayo cromogénico y en la generación de plasmina, a la vez que tiene la mayor afinidad en Biacore.

Tabla 13: Resumen de la afinidad y potencia de anticuerpos monoclonales contra PAI-1 glicosilado humano

Anticuerpo	Ensayos cromogénicos (nM)	Generación de plasmina (nM)	Afinidad Kd (M)	Mecanismo de acción
A39 (IgG1/k)	1,70, 1,00	5,4	1,16E-11	SH o latente
A44 (IgG1/k)	1,66, 1,50, 1,70	3,32	4,20E-14	sustrato
A71 (IgG1/k)	Aprox. 4,00	8,61	ND	SH o latente
A75 (IgG2a/k)	3,00	22,6	1,20E-10	SH o latente
A105 (IgG1/k)	7,00	27,0	4,20E-11	SH o latente
B28 (IgG2b/k)	1,80	7,28	6,5E-10	SH o latente
B109 (IgG1/k)	0,23	6,11	ND	SH o latente
C26 (IgG1/k)	5,00	Inactivo	ND	sustrato
C45 (IgG2b)	0,5	10,6	ND	sustrato
E16 (IgG1)	1,1	4,74	ND	SH o latente

E21 (IgG2b)	1,3	216,0	ND	sustrato
SH = impedimento estérico; ND = no determinado				

Las secuencias de las cadenas pesada y ligera mostradas en la Tabla 1 están alineadas en la Figura 12, y las CDRs, como se definen mediante IMGT, están destacadas en negrita. En base a los datos in vitro presentados en la Tabla 13, A44 se seleccionó para la humanización.

## 5 Ejemplo 12: Manipulación del Fab de A44anti-PAI-1: humanización, estabilización y mutación de motivos de secuencias indeseados

Se tomaron varios enfoques explicados más abajo para humanizar, estabilizar y optimizar los motivos de secuencias del anticuerpo murino A44 contra PAI-1.

### 1) Humanización

El protocolo de humanización usado se ha descrito en el documento PCT/US08/74381 (US20110027266). Se usaron las secuencias de cadena ligera variable (VL) y de cadena pesada variable (VH) de A44 murino para construir un modelo de homología de cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de A44 anti-PAI-1 en Molecular Operating Environment (MOE; v. 2010.10; Chemical Computing Group). Se usaron los siguientes moldes: estructura de cadena ligera - 1D5I (identidad de 94% en las regiones estructurales), estructura de cadena pesada - 3KSO (identidad de 96% en las regiones estructurales), L1 - 1D5I (identidad de 94%), L2 - 1D5I (identidad de 94%), L3 - 1AXS (identidad de 72%), H1 - 1IC7 (identidad de 82%), H2 - 1MBU (identidad de 68%) y H3 - 2WDB (identidad de 62%). El bucle H3 fue particularmente difícil de modelar puesto que Trp es el primer resto. 2WDB, aunque es un bucle más corto, también tiene un Trp al comienzo del bucle, y la misma secuencia Phe-Asp-Tyr al final del bucle H3. Se reconstruyeron las cadenas laterales de Glu-105 (LC) e His-99, y el modelo subsiguiente se minimizó energéticamente usando los procedimientos estándar implementados en MOE. Se llevó a cabo subsiguientemente una simulación de dinámica molecular (MD) del modelo de homología 3D minimizado del A44 murino, con restricciones en la cadena principal proteica a una temperatura de 500 K durante 1,1 nanosegundos (ns) en disolvente implícito de Born generalizado. Se extrajeron diez conformaciones diversas a partir de este primer experimento de MD cada 100 picosegundos (ps) durante el último 1 ns. Estas diversas conformaciones se sometieron entonces cada una a una simulación de MD, sin restricciones en la cadena principal proteica y a una temperatura de 300 K, durante 2,3 ns. Para cada una de los 10 experimentos de MD, entonces se usaron las últimas 2.000 instantáneas, una cada ps, a partir de la trayectoria de MD, para calcular, para cada aminoácido de A44 murino, sus desviaciones de la raíz cuadrática media (rmsd) en comparación con una posición medioda de referencia. Al comparar la rmsd promedio en los 10 experimentos de MD separados de un aminoácido dado con la rmsd promedio global de todos los aminoácidos de A44 murino, se decide si el aminoácido es suficientemente flexible, como se observa durante la MD, para considerarlo que interacciona probablemente con receptores de células T y es el responsable de la activación de la respuesta inmune. Los 37 aminoácidos se identificaron como flexibles en el anticuerpo A44 murino, excluyendo la CDR y su vecindad de 5 Å inmediata.

El movimiento de los 62 aminoácidos de A44 murino más flexibles, durante los 20 ns (10 x 2 ns), se comparó entonces con el movimiento de los aminoácidos flexibles correspondientes de 49 modelos de homología de línea germinal humana, para cada uno de los cuales se realizaron las simulaciones de MD de 10 x 2 ns. Los 49 modelos de línea germinal humana se construyeron combinando sistemáticamente las 7 cadenas ligeras de línea germinal humana más comunes (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambd1, vlambd2, vlambd3) y las 7 cadenas pesadas de línea germinal humana más comunes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). El anticuerpo de línea germinal humana vk1-vh2 mostró una similitud 4D de 0,58 de los aminoácidos flexibles en comparación con los aminoácidos flexibles del anticuerpo A44 murino; el anticuerpo de línea germinal vk1-vh2 se usó por lo tanto para humanizar el anticuerpo A44 centrándose en los aminoácidos flexibles. La línea germinal humana vlambd3-vh4 mostró la segunda similitud 4D más elevada, 0,57, y también se usó como la base para la humanización del anticuerpo A44. Para la asociación de aminoácidos por parejas entre los aminoácidos de A44 murino y vk1-vh2, las 2 secuencias se alinearon en base a la superposición 3D óptima de los carbonos alfa de los 2 modelos de homología correspondientes. La asociación de aminoácidos por parejas entre A44 murino y vlambd3-vh4 se llevó a cabo de la misma manera. La Figura 13 muestra la alineación de la cadena ligera de A44 murino con vk1 y vlambd3. La Figura 14 muestra la alineación de la cadena pesada de A44 murino con vh2 y vh4.

### 2) Estabilización

#### 50 a) Enfoque basado en el conocimiento

Se propuso que los aminoácidos de las cadenas ligera y pesada con baja frecuencia de aparición frente a sus secuencias canónicas respectivas, excluyendo las CDRs, estaban mutados en los aminoácidos encontrados más frecuentemente ( $\Delta\Delta G_{th} > 0,5$  kcal/mol; (E. Monsellier, H. Bedouelle. J. Mol. Biol. 362, 2006, p. 580-593)). Esta primera lista de mutaciones de consenso para la LC y HC se ha restringido a los aminoácidos encontrados en la línea germinal humana más próxima (vk1-vh2). Los cambios sugeridos en la vecindad inmediata de los CDRs (zona

“Vernier” de 5 Angstroms (J. Mol. Biol. 224, 1992, p. 487-499)) no se consideraron. Esto dio como resultado dos mutaciones estabilizantes en la LC (véase la Tabla 15) y cinco mutaciones estabilizantes en la HC (véase la Tabla 16). Se tomaron en cuenta otros criterios para considerar estas mutaciones para estabilizar potencialmente el anticuerpo A44 anti-PAI-1. Estos criterios fueron un cambio favorable de la hidropatía en la superficie, o una estabilización predicha del mutante en base a mecánica molecular. También, se dieron a conocer mutaciones estabilizantes adicionales exitosas en la bibliografía (E. Monsellier y H. Bedouelle, J. Mol. Biol., 362, 2006, p. 580-593; B.J. Steipe et al. J. Mol. Biol, 1994, 240, 188-192), y se consideraron (véanse las Tablas 17 y 18); sin embargo, no se sugirieron mutaciones adicionales.

Tabla 15: Cambios estabilizantes propuestos en la cadena ligera

Resto	Cambio propuesto	$\Delta\Delta G_{th}$ calculado	Cambio aceptado
Lys-3	Val	2,23998	No - no en línea germinal
Met-11	Leu	0,766432	Ya cambiado en la humanización
Tyr-12	Ser	2,04389	Ya cambiado en la humanización
Leu-36	Val	2,17091	No – Vernier
Lys-42	Gln	0,939652	No - no en línea germinal
Thr-46	Leu	2,01966	No-Vernier
Gln-69	Thr	2,16357	No-Vernier
Tyr-80	Ala	2,92454	Ya cambiado en la humanización
Met-83	Leu	2,57007	Ya cambiado en la humanización
Gly-84	Ala	0,597822	Sí
Ile-85	Thr	1,27255	Sí

Tabla 16: Cambios estabilizantes propuestos en la cadena pesada

Resto	Cambio propuesto	$\Delta\Delta G_{th}$ calculado	Cambio aceptado
Glu-1	Gln	0,562423	Sí
Met-2	Val	3,41361	No - Vernier
Glu-6	Gln	0,655069	No - no en línea germinal
Pro-9	Ala	0,505324	No - no en línea germinal
Ser-10	Glu	2,40018	Ya cambiado en la humanización
Gln-16	Ala	1,11244	No - no en línea germinal
Thr-17	Ser	1,79135	No - no en línea germinal
Leu-18	Val	0,760243	No - no en línea germinal
Ser-19	Lys	1,20539	No - no en línea germinal
Thr-21	Ser	1,3289	No - no en línea germinal
Ser-23	Lys	1,82798	No - no en línea germinal
Val-24	Ala	1,35286	No - no en línea germinal
Thr-25	Ser	1,72008	Sí
Ile-37	Val	1,66985	No - no en línea germinal

Arg-38	Lys	0,568427	No - no en línea germinal
Lys-39	Gln	2,27769	Sí
Phe-40	Arg	1,81199	No - no en línea germinal
Asn-43	Lys	1,42568	Ya cambiado en la humanización
Lys-44	Gly	2,01606	Ya cambiado en la humanización
Tyr-47	Trp	2,62805	No - Vernier
Met-48	Ile	1,67766	No - Vernier
Pro-61	Glu	1,08569	No - no en línea germinal
Ser-62	Lys	0,840485	No - no en línea germinal
Leu-63	Phe	1,25428	No - no en línea germinal
Arg-66	Lys	0,528008	No - no en línea germinal
Ile-67	Ala	1,93707	No - Vernier
Ser-68	Thr	1,36475	Sí
Ile-69	Leu	0,550185	No - Vernier
Arg-71	Val	0,61536	No - Vernier
Asn-72	Asp	3,40632	Sí
Thr-73	Lys	0,5597	No - Vernier
Lys-75	Ser	0,81321	No - No en línea germinal
Asn-76	Ser	0,744463	No - No en línea germinal
Gln-77	Thr	1,30652	No - No en línea germinal
Tyr-78	Ala	2,54699	No - Vernier
Val-85	Leu	1,71111	No - No en línea germinal
Thr-87	Ser	1,30394	No - No en línea germinal
Thr-90	Ser	0,557686	No - No en línea germinal
Thr-92	Val	1,13795	No - No en línea germinal

Tabla 17: Combinaciones de mutaciones estabilizantes evaluadas

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

S2 (H1 & H3)	Ninguno	No
*Nota: numeración secuencial usada para referirse a los restos		

Tabla 18\*: Mutaciones de estabilización evaluadas

Resto de cadena ligera*	Cambios adicionales sugeridos	Cambio aceptado
15->L	V15->L	No - V15 en línea germinal Vk1
90->C	Ninguno - ya Q90	Ninguno
32->Y	Ninguno - ya Y32	Ninguno
106->I	Ninguno - ya I106	Ninguno
63->S	Ninguno - ya S63	Ninguno
21->I	Ninguno - ya M21	Ninguno
* Nota: numeración secuencial usada para referirse a los restos		

## b) Enfoques basados en 3D y MD

- Se han dado a conocer previamente enfoques basados en 3D y MD informado (Seco J., Luque F.J., Barril X., J. Med. Chem. 2009 Apr 23;52(8):2363-71; Malin Jonsson et al., J. Phys. Chem. B 2003, 107:5511-5518). Las regiones hidrófobas del anticuerpo se identificaron explícitamente analizando la simulación de dinámica molecular del Fab en disolvente binario (20% de isopropanol en agua, simulación de producción de 20 ns). Se completó el análisis adicional usando un mapa de superficie hidrófoba en el software maestro de Schrodinger (v. 8.5.207). La superficie de la proteína analizada mediante estos dos métodos es bastante hidrófila. Incluso con estas dos técnicas, no había restos que contribuyeran a ningún parche hidrófobo en las superficies, y por lo tanto no se sugirieron mutaciones anti-agregación.

## 3) Humanización mediante injerto

- La humanización usando técnicas de injerto se ha dado a conocer previamente (P. T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, G. Winter, Nature 1986, 321:522-525). La humanización comenzó identificando las dos líneas germinales humanas más próximas a las cadenas ligera y pesada del dominio variable de A44 anti-PAI1. Esto se realizó llevando a cabo una búsqueda BLAST frente a todas las líneas germinales humanas que se enumeraron sistemáticamente (todas las posibles combinaciones de los dominios V y J para las cadenas kappa y lambda; dominios V, D y J para las cadenas pesadas). Las búsquedas BLAST se llevaron a cabo usando una aplicación de intranet enlazada al servicio de Sequence Information Retrieval and Analysis (SIRA) proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

- La línea germinal humana más próxima se identificó con 70% y 67% de identidad de secuencia con respecto a las cadenas ligera y pesada del dominio variable de A44 anti-PAI1, respectivamente. Usando las secuencias de línea germinal internas de VBASE, se encontró que la cadena ligera estaba próxima al locus V $\lambda$ -O18 (aproximadamente 64% de identidad), y la cadena pesada estaba próxima al locus 4-30 (aproximadamente 69% de identidad) de la subfamilia VH4. Las regiones CDR (en base a Kabat) y los restos Vernier están indicados en cursiva para la cadena ligera de mA44 (A44LC) y para IGVK1-33-01\_IGKJ4-01 (IGVK1). Los restos vernier como se definen en J. Mol. Biol., 1992, 224, 487, están subrayados. Las mutaciones humanizantes (en negrita) se obtuvieron llevando a cabo una comparación por parejas de las dos secuencias alineadas, excluyendo los restos de CDR y de la zona Vernier (también subrayados en murino) como se define anteriormente. T46L y Q69T de la cadena ligera murina, y M2V en la cadena pesada murina (resto de la zona Vernier), estaban mutados a la secuencia de línea germinal humana predominantemente conservada como una parte de la humanización mediante el enfoque de injerto (LC5a, HC5a). En otra variante, estos tres restos de la zona Vernier se retuvieron, como se observa en la secuencia murina original (LC5b, HC5b).

mA44 – Cadena ligera (SEQ ID NO: 141)

*D*KMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR

*ANR*SVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTEGG

35    GTKLEIK

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

DI**Q**MTQSPSS **LS**ASV**GDR**VT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK**AP**KLLIYD

ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FT**T**FTIS**SLQ**P EDI**I**ATYYCQQ YDNLPLTFGG

GTKVEIK

mA44 – Cadena pesada (SEQ ID NO: 140)

EMQLQESGPS LVKPSQTL**SL** TCSVT**GDSMT** *NGYWNWIRKF*

PGNKLE**YMGY** *ITYSGSTYYN* PSLKGR**ISIT** *RNTSKNQYYL*

QLSSVT**T**EDT ATYYC**AR**WHY *GSPYYFDYWG* QGTTLTVSS

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

**Q**VQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SYYWSWIR**Q**P

PG**K**GLEWIGY IYSGSTNYN PSLKSRV**TIS** VDTSKNQFSL

KLSSVTAADT AVYYCARGYS SSWYYFDYWG QGTLVTVSS

- 5 La siguiente línea germinal humana más próxima se identificó con una identidad de secuencia de 59% y 58% con respecto a las cadenas ligera y pesada del dominio variable de A44 anti-PAI1, respectivamente. Usando la línea germinal de VBASE interna, se encontró que esta cadena ligera está próxima al locus VkIII-L6 ( ~56% de identidad), y la cadena pesada está próxima al locus 6-01 de la subfamilia VH6. Las regiones CDR (en base a Kabat) y las regiones Vernier están indicadas en cursiva. Las regiones Vernier (como se definen en J. Mol. Biol., 1992, 224, 487)
- 10 están subrayadas. Las mutaciones humanizantes se obtuvieron llevando a cabo una comparación por parejas de las 2 secuencias alineadas, excluyendo los restos de CDR y de la zona Vernier (también subrayados en murino) como se define anteriormente, y se muestran en negrita.

mA44 – Cadena ligera (SEQ ID NO: 141)

D**I**K**M**TQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN *SYLSWL*QQKP GKSPK**TLIYR**

*ANRSVD*GVPS RFS**GSGSGQD** *YSL*TISSLEY EDMGIYY**CLQ** *YDEF*PPT**F**GG

GTKLEIK

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

**E**IVLTQSPAT **LSL**SPGERAT **L**SCRASQSVS SYLAWYQQKP **GQ**AP**R**LLIYD

ASNRATGIPA RFSGSGSGRD FT**L**TISSLE**P** ED**F**AVYYCQQ RSNWPLTFGG

15 GTKVEIK

mA44 – Cadena pesada (SEQ ID NO: 140)

EMQLQESGPS LVKPSQTL**SL** TCSVT**GDSMT** *N..GYWNWIR*

KFPNGKLE**YMGYIT**..*YSGS* TYYNPSLKGR *ISITRN*TSKN

*QYYL*QLSSVT TEDTATYYC**A** *RWHYGSPYYF* *DYWG*QGTTLT VSS

IGHV6-1-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 (SEQ ID NO: 144)

**QVQLQQSGPG LVKPSQTL<sup>SL</sup> TCAISGDSVS SNSAAWNWIR**

**QSPSRGLEWL GR<sup>TY</sup>YRSKWY NDYAVSVKSR ITINPD<sup>TSKN</sup>**

**QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA RGYSSSWYYF DYWGQGT<sup>LV</sup>T VSS**

#### 4) Mutación de motivos de secuencias indeseados

Se consideraron los siguientes motivos de secuencias: Asp-Pro (enlace lábil a ácidos), Asn-X-Ser/Thr (glicosilación, X = cualquier aminoácido menos Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (formación de succinimida/iso-asp en regiones flexibles), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (sitios de desamidación expuestos), y Met (oxidación en áreas expuestas). Los dominios VL y VH de A44 murino anti-PAI1 poseen dos sitios potenciales de glicosilación: N<sup>52</sup>RS (en CDR2) en la LC, y N<sup>72</sup>TS en la HC. Un sitio de desamidación expuesto está presente en CDR1 de la HC (N<sup>31</sup>G). En la secuencia murina original se identificaron tres sitios potenciales de formación de succinimida: D<sup>56</sup>G (extremo de CDR2) en la LC, y D<sup>27</sup>S (en CDR1) y D<sup>89</sup>T en la HC. Los motivos problemáticos de LC, N<sup>52</sup>RS y D<sup>56</sup>G, están ambos en CDR2. Puesto que estas mutaciones aparecen en una CDR, se abordaron mediante mutación en dos secuencias manipuladas propuestas a continuación (LC2 y LC4). N<sup>52</sup> estaba mutado de forma conservativa a Gln, y D<sup>56</sup> estaba mutado a Glu. Hay cuatro restos problemáticos existentes en la HC. Los primeros dos aparecen en CDR1: el sitio de formación de succinimida potencial, D<sup>27</sup>S, y el sitio de desamidación N<sup>31</sup>G. En la tercera región estructural también aparecen dos motivos problemáticos adicionales. En CDR1, D<sup>27</sup> estaba mutado a un E, para evitar la formación de succinimida, mientras que N<sup>31</sup> se alteró a un Q. N<sup>72</sup> y D<sup>89</sup> se alteraron a Q y E, respectivamente. Estos motivos problemáticos se abordaron en secuencias manipuladas HC2a y HC4 descritas más abajo. La variante HC2b contiene solamente la mutación del sitio de desamidación N<sup>31</sup>G.

Las secuencias humanizadas resultantes se trasladaron al programa BLAST en busca de la similitud de secuencia frente a la base de datos IEDB (encontrada en internet en [immuneepitope.com](http://immuneepitope.com), versión junio 2009; Vita R., Zarebeski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The immune epitope database 2.0 Nucleic Acids Res. 2010, enero, 38 (publicación de base de datos): D854-62. Epub 2009, Nov 11) para asegurarse de que ninguna de las secuencias contiene cualesquiera epítopos de células B o T humanas conocidos (identidad de secuencia de 70% usada como corte para los resultados obtenidos a través de la búsqueda de BLAST y considerando solamente los resultados de la especie humana). DeClerck, et al. (Publicación Internacional n° WO 2002034776) han descrito epítopos de unión a anticuerpo de PAI-1, ninguno de los cuales son problemáticos para los epítopos descritos aquí.

Para la LC de A44 murino, hay un epítipo humano de Kirschmann et al. (The Journal of Immunology, 1995, 155, 5655-5662). Posee una identidad de ~71% a lo largo de un tramo de 14 aminoácidos, como se observa más abajo. La secuencia objeto fue una secuencia parcial que se no ha verificado mediante espectrometría de masas. Para este péptido no se da a conocer ningún dato de unión. Este epítipo se observó en todas las variantes de LC propuestas. No se identificaron epítopos potencialmente problemáticos cuando se llevó a cabo una búsqueda similar para la HC.

#### 5) Secuencias originales de dominios variables anti-PAI1

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

Cadena ligera (SEQ ID NO: 142)

1 DI**KMTQSPSS** MYASLGERTV ITCKASQDIN SYLSWL**Q**QKP GKSPK**TLIYR**  
51 **ANRSVDG**VPS RFS**GS**GS**GQD** YSLTISSLEY EDMGIYY**CLQ YDEFPPT**EGG

101 GTKLEIKRAD AAPT**VSIF**

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

40 Cadena pesada (SEQ ID NO: 140)

1 EMQLQESGPS LVKPSQTL<sup>SL</sup> TCSVT**GDSMT** NGYWNWIRKF PGNKLE**YMGY**  
51 **ITYSGSTYYN** PSLKGRISIT RNTSKNQYYL QLSSVT**TEDT** ATYYC**ARWHY**  
101 **GSPYYFDY**WG QGTT**LT**VSS

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

#### 6) Secuencias manipuladas

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

a) Secuencias de cadena ligera manipuladas

LC1a contiene siete mutaciones derivadas del método de humanización 4D usando la secuencia de línea germinal más próxima, vk1. LC1b tiene 12 mutaciones derivadas de la humanización 4D con la segunda secuencia de línea germinal humana más próxima, vl3. LC2 contiene 2 mutaciones adicionales en CDR2, en comparación con LC1a. Estas mutaciones apuntan a un sitio de glicosilación potencial (N<sup>52</sup>RS) y un sitio potencial de formación de succinimida (D<sup>56</sup>G). LC3 contiene las mutaciones de la humanización 4D a la secuencia de línea germinal más próxima, con 2 mutaciones estabilizantes adicionales. LC4 combina las mutaciones humanizantes, estabilizantes y de motivos indeseados. Las CDR y las zonas vernier están en cursiva, los restos vernier están subrayados, las mutaciones humanizantes están en negrita, los motivos problemáticos están con tachado doble, y las mutaciones estabilizantes se muestran en minúsculas. Las Figuras 16 y 17 muestran sumarios de las mutaciones.

LC1a (SEQ ID NO: 91):

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLQP EDLGIYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKLEIK

En la base de datos IEDB, no se encontraron epítomos humanos adicionales para la secuencia LC1a. Índice de germinalidad de LC1a = 76% con IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC1b (SEQ ID NO: 92):

1 DIKMTQSPSS VSVSPGQTVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GQSPKTLIYR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLQA MDEGIYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKLTIK

Además del epítomo descrito en la sección 4 anterior, K39PGQSPKTLI tiene una identidad de secuencia de 70% con KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Se informa que este péptido tiene una IC<sub>50</sub> >100.000 nM frente a todos los alelos de HLA-DR para los cuales se ensayó. Índice de germinalidad de LC1b = 67% con IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC2 (SEQ ID NO: 93):

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
51 AQRSVFEGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLQP EDLGIYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKLEIK

En la base de datos IEDB, no se encontraron epítomos humanos adicionales para la secuencia LC2. Índice de germinalidad de LC2 = 76% con IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC3 (SEQ ID NO: 94):

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLQP EDLatYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKLEIK

En la base de datos IEDB, no se encontraron epítomos humanos adicionales para la secuencia LC3. Índice de germinalidad de LC3 = 78% con IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC4 (SEQ ID NO: 95):

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
51 AQRSVFEGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLQP EDLatYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKLEIK

En la base de datos IEDB, no se encontraron epítomos humanos adicionales para la secuencia LC4. Índice de germinalidad de LC4 = 78% con IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC5a (SEQ ID NO: 96):

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKLLIYR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGTD YTFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKVEIK

Además del epítipo descrito en la sección 4 anterior, A43PKLLIYRAN tiene una identidad de secuencia de 80% con respecto a APKLLIYAASSL (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). El peso molecular no se determinó en este péptido, y no se dio ningún dato de unión. Índice de germinalidad de LC5a = 85% con IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC5b (SEQ ID NO: 97):

1 D~~I~~QMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKTLIYR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YTFTISLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKVEIK

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítipos humanos adicionales para la secuencia LC5b. Índice de germinalidad de LC5b = 83% con IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC5c (SEQ ID NO: 98):

1 E~~I~~VMTQSPAT LSLSPGERAT LSCCKASQDIN SYLSWLQQKP GQAPRTLIYR  
51 ANRSVDGIPA RFSGSGSGQD YTLTISLEP EDFAVYYCLQ YDEFPPTEGG  
101 GTKVEIK

Además del epítipo descrito en la sección 4 anterior, K<sup>39</sup>PGQAPRTLI tiene una identidad de secuencia de 80% con respecto a KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Se informa que este péptido tiene una IC50 >100.000 nM frente a todos los alelos de HLA-DR para los que se ensayó. Índice de germinalidad de LC5c = 79% con IGKV3-11-02\_IGKJ4-01 [Vkl-L6]. En la Figura 15 se muestra un esquema de todas las mutaciones de la cadena ligera.

b) Secuencias de cadena pesada manipuladas

HC1a contiene ocho mutaciones derivadas del método de humanización 4D con la secuencia de línea germinal humana más próxima. HC1b contiene seis mutaciones derivadas del método de humanización 4D con la 2ª secuencia de línea germinal más próxima. HC2a contiene cuatro mutaciones adicionales cuando se compara con HC1a para apuntar motivos de secuencias indeseados. HC2b solamente aborda el sitio de desamidación en CDR1 (N<sup>31</sup>G). HC3 contiene las mutaciones humanizantes de HC1a con cinco mutaciones estabilizantes adicionales. HC4 contiene mutaciones humanizantes de HC1a, mutaciones estabilizantes de HC3, y las mutaciones que abordan las mutaciones problemáticas de HC2a. Las CDRs y las zonas vernier están en cursiva, los restos vernier están subrayados, las mutaciones humanizantes están en negrita, los motivos problemáticos están doblemente tachados, y las mutaciones estabilizantes se muestran en minúsculas.

HC1a (SEQ ID NO: 82):

1 EMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKALEYMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL TLSSVTTVD~~T~~ ATYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítipos humanos para la secuencia HC1a. Índice de germinalidad de HC1a = 68% con IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC1b (SEQ ID NO: 83):

1 EMQLQESGPG LVKPSETL~~SL~~ TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKGLEYMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL KLSSVTTADT ATYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítipos humanos para la secuencia HC1b. Índice de germinalidad de HC1b = 73% con IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC2a (SEQ ID NO: 84):

1 EMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVTGESMT QGYWNWIRKF PGKALEYMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RQTSKNQYYL TLSSVTTVET ATYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítipos humanos para la secuencia HC2a. Índice de germinalidad de HC2a = 67% con IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC2b (SEQ ID NO: 85):

1 EMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVTGDSMT ~~Q~~GYWNWIRKF PGKALEYMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKGRIST RNTSKNQYYL TLSSVTTVD~~T~~ ATYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítomos humanos para la secuencia HC2b. Índice de germinalidad de HC2b = 67% con IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC3 (SEQ ID NO: 86):

1 qMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVsGDSMT ~~Q~~GYWNWIRqF PGKALEYMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKGRHIT RdTSKNQYYL TLSSVTTVD~~T~~ ATYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

- 5 En la base de datos IEDB, no se identificaron epítomos humanos para la secuencia HC3. Índice de germinación de HC3 = 72% con IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC4 (SEQ ID NO: 87):

1 qMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVsGESMT ~~Q~~GYWNWIRqF PGKALEYMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKGRHIT R~~Q~~TSKNQYYL TLSSVTTVE~~T~~ ATYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítomos humanos para la secuencia HC4. Índice de germinación de HC4 = 70% con IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC5a (SEQ ID NO: 88):

1 QYQLQESGPG LVKPSETL~~SL~~ TCTVSGDSMT ~~Q~~GYWNWIRQP PGKGLE~~Y~~MGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKSRITS RNTSKNQYSL KLSSVTAADT AVYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTLVTVSS

10

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítomos humanos para la secuencia HC5a. Índice de germinación de HC5a = 84% con IGHV4-59-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5b (SEQ ID NO: 89):

1 QMQLQESGPG LVKPSETL~~SL~~ TCTVSGDSMT ~~Q~~GYWNWIRQP PGKGLE~~Y~~MGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKSRITS RDTSKNQYSL KLSSVTAADT AVYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTLVTVSS

15

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítomos humanos para la secuencia HC5b. Índice de germinalidad de HC5b = 84% con IGHV4-59-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5c (SEQ ID NO: 90):

1 QMQLQQSGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCAISGDSMT ~~Q~~GYWNWIRQS PSRGLE~~Y~~MGY  
51 ITYSGSTYYA VSVKSRITN RDTSKNQYSL QLSSVTPEDT AVYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTLVTVSS

En la base de datos IEDB, no se identificaron epítomos humanos para la secuencia HC5c. Índice de germinalidad de HC5c = 78% con IGHV6-1-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 [VH6 6-01].

En la Figura 16 se muestra un esquema de todas las mutaciones de cadena pesada.

20

c) Combinaciones de secuencias variantes de cadenas pesada y ligera

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

25

derivadas del injerto en la segunda secuencia de línea germinal humana más próxima, y retuvo la CDR murina y todos los restos de la zona Vernier murinos.

HC5a contiene 20 mutaciones derivadas del injerto a la secuencia de línea germinal humana más próxima, y retuvo la CDR murina y la mayoría de los restos de la zona Vernier murinos, con la excepción de M2V. Met aparece con una tendencia muy baja en esta posición en las secuencias de línea germinal humana. HC5b contiene 20 mutaciones derivadas del injerto a la secuencia de línea germinal humana más próxima, y retuvo la CDR murina y todos los restos de la zona Vernier murinos. HC5c contiene 23 mutaciones derivadas del injerto a la segunda secuencia de línea germinal humana más próxima, y retuvo la CDR murina y todos los restos de la zona Vernier murinos.

- 10 En total, se prepararon diez combinaciones (resumidas en la Tabla 19):
- LC1a x HC1a (mutaciones que abordan la humanización 4D en base a la secuencia de línea germinal más próxima)
  - LC1b x HC1b (mutaciones que abordan la humanización 4D en base a la 2ª secuencia de línea germinal más próxima)
  - 15 • LC2 x HC2a (mutaciones que abordan la humanización 4D y secuencias indeseadas)
  - LC2 x HC2b (mutaciones que abordan la humanización 4D y secuencias indeseadas)
  - LC1a x HC2b (mutaciones que abordan la humanización 4D y secuencias indeseadas)
  - LC3 x HC3 (mutaciones que abordan la humanización 4D y la estabilización)
  - LC4 x HC4 (mutaciones que abordan la humanización 4D, secuencias indeseadas y estabilización)
  - 20 • LC5a x HC5a (mutaciones que abordan la humanización mediante el injerto que retienen las CDRs y que incorporan 3 modificaciones Vernier conservativas)
  - LC5b x HC5b (mutaciones que abordan la humanización mediante injerto que retienen las CDRs y las regiones Vernier)
  - 25 • LC5c x HC5c (mutaciones que abordan la humanización mediante injerto que retienen las CDRs y regiones Vernier)

Tabla 19: Sumario de las diez combinaciones LC x HC

	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H+UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H+UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
<b>HC1a (H)</b>	X(1)							
<b>HC1b (H)</b>		X(2)						
<b>HC2a (H+UM)</b>			X(3) Bajo					
<b>HC2b (H+UM)</b>	X(4)		X(5)					

<b>HC3 (H+S)</b>			X(11)	X(6)	X (12)			
<b>HC4 (H+UM+S)</b>					X(7) Bajo			
<b>HC5a (G)</b>						X(8)		
<b>HC5b (G)</b>			X(13)		X(14)		X(9)	
<b>HC5c (G)</b>								X(10) Bajo

H = humanizante; UM = motivos indeseados; S = estabilizador; G = injerto  
 Bajo = niveles de expresión bajos  
 Número dentro del () indica el número de la variante; nota: las variantes 11 - 14 se añadieron tras la caracterización de las diez variantes originales (variantes 1-10)

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

Numeración secuencial de LC	<b>LC1a (H)</b>	<b>LC1b (H)</b>	<b>LC2 (H-UM)</b>	<b>LC3 (H+S)</b>	<b>LC4 (H-UM+S)</b>	<b>LC5a (G)</b>	<b>LC5b (G)</b>	<b>LC5c (G)</b>
Asp1								Glu
Lys3						Gln	Gln	Val
Ser9								Ala
Ser10								Thr
Met11	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
Tyr12	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Ala13		Val						Leu
Leu15	Val	Pro	Val	Val	Val	Val	Val	Pro
Glu17	Asp	Gln	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	
Arg18		Thr						

ES 2 770 507 T3

Val19								Ala
Ile21								Leu
Thr22								Ser
Lys42		Gln						Gln
Ser43						Ala	Ala	Ala
Lys45								Arg
Thr46						Leu		
Asn52			Gln		Gln			
Asp56			Glu		Glu			
Val58								Ile
Ser60								Ala
Gln69						Thr		
Ser72						Thr	Thr	Thr
Leu73						Phe	Phe	
Glu79	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	
Tyr80	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Glu81		Met						
Met83	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe
Gly84				Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Ile85				Thr	Thr	Thr	Thr	Val

Leu104						Val	Val	Val
Glu105		Thr						
Número de mutaciones	7	12	9	9	11	16	14	22
H = humanizante; UM = motivos indeseados; S = estabilizador; G = injerto								

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

Numeración secuencial de HC	HC1a (H)	HC1b (H)	HC2a (H-UM)	HC2b (H-UM)	HC3 (H+S)	HC4 (H-UM+S)	HC5a (G)	HC5b (G)	HC5c (G)
Glu1					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Met2							Val		
Gln3	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Glu5	Lys		Lys	Lys	Lys	Lys			Gln
Ser10	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly
Ser15	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Gln16		Glu					Glu	Glu	
Ser23							Thr	Thr	Ala
Val24									Ile
Thr25					Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Asp27			Glu			Glu			

Asn31			Gln	Gln		Gln			
Lys39					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Phe40							Pro	Pro	Ser
Gly42									Ser
Asn43	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg
Lys44	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly
Asn60									Ala
Pro61									Val
Leu63									Val
Gly65							Ser	Ser	Ser
Ser68					Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
Thr70							Ser	Ser	Asn
Asn72			Gln		Asp	Gln		Asp	Asp
Tyr79							Ser	Ser	Ser
Gln81	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Lys	
Thr87							Ala	Ala	Pro
Glu88	Val	Ala	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	
Asp89			Glu			Glu			
Thr92							Val	Val	Val
Thr114							Leu	Leu	Leu

Leu115							Val	Val	Val
Número de mutaciones	8	6	12	9	13	16	20	20	23
H = humanizante; UM = motivos indeseados; S = estabilizador; G = injerto									

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

#### 5 7) Caracterización de las variantes de humanización

En base a la formación de modelos *in silico* presentada en el ejemplo anterior, se generaron diez variantes (variantes 1-8 mediante humanización 4D, y variantes 9-10 mediante injerto de CDR; las variantes 3 y 10 se crearon sobre la segunda línea germinal más próxima). Para la expresión de HEK293, se preparó la región variable del ADN de cadena ligera y de cadena pesada de A44 humanizado. Las proteínas se generaron tras clonar el ADN correspondiente en los plásmidos pXL (New England Biolabs; NheI/Eco47III para la HC, NheI/BsiWI para la LC). Las secuencias humanizadas se optimizaron en el uso de codones para la expresión de HEK, y el gen se sintetizó mediante GeneArt (subsidiaria de Life Technologies). Los plásmidos resultantes se cotransfectaron y se expresaron transitoriamente en el sistema de expresión FreeStyle™293 (Invitrogen, nº de Cat K9000-01). Las variantes 3 y 10 se expresaron muy mal, y no se llevaron adelante adicionalmente. Todas las otras variantes se expresaron y purificaron usando columnas de Proteína A. Los geles analíticos mostraron glicosilación parcial (alrededor de 5 - 10%) de las cadenas ligeras en las variantes 6 y 9, y de las cadenas pesadas en las variantes 5 y 7 (datos no mostrados). Las ocho variantes restantes se estudiaron en el ensayo cromogénico usando hPAI y el ensayo de generación de plasmina en células estrelladas humanas usando PAI glicosilado humano. Los resultados se muestran en la Tabla 23.

20 Tabla 23: Caracterización de las variantes de humanización en el ensayo de generación de plasmina y en el ensayo cromogénico

mAb	Activación del plasminógeno		Ensayo cromogénico
	IC50 (nM)	Y50%	IC50 (nM)
<b>A44</b>	3,17	45,99	0,44
<b>A44-hv1</b>	3,12	44,99	0,49
<b>A44-hv2</b>	No determinado	No determinado	0,60
<b>A44-hv4</b>	Inactivo	26,00	0,52
<b>A44-hv5</b>	No determinado	No determinado	1,11
<b>A44-hv6</b>	1,78	56,94	0,82
<b>A44-hv7</b>	No determinado	No determinado	0,59
<b>A44-hv8</b>	Inactivo	11,00	0,76
<b>A44-hv9</b>	1.9	46,53	0,86

25 Las variantes 6 y 9 mostraron la mejor potencia en el ensayo de generación de plasmina, pero tuvieron una glicosilación parcial (5 - 10%) en la cadena ligera. En base a estos resultados, se produjeron nuevas variantes 11-14 usando combinaciones de cadenas pesadas procedentes de las variantes 6 y 9 y de cadenas ligeras procedentes de las variantes 5 y 7. La Tabla 24 resume todas las variantes creadas.

Tabla 24: Variantes de humanización

Variante #	Descripción	SEQ ID NOs
A44-hv1	LC1a x HC1a	109
A44-hv2	LC1b x HC1b	110
A44-hv3	LC2 x HC2a	111
A44-hv4	LC1a x HC2b	112
A44-hv5	LC2 x HC2b	113
A44-hv6	LC3 x HC3	114
A44-hv7	LC4 x HC4	115
A44-hv8	LC5a x HC5a	116
A44-hv9	LC5b x HC5b	117
A44-hv10	LC5c x HC5c	118
A44-hv11	LC2 x HC3	119
A44-hv12	LC4 X HC3	120
A44-hv13	LC2 x HC5b	121
A44-hv14	LC4 x HC5b	122

Tabla 25: Variantes de humanización de secuencias de ADN

	Gen	Proteína
HC1a	GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTCCCCGGCAAGGCCCTCG	EMTLKESGPTLVKPTQTL TCSVTGDSMTNGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL
	AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 123)	TLSSVTTVDATATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 82)
HC1b	GAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTG GTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCA GCGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTG GAACTGGATCCGGAAGTCCCCGGCAAGGGCCTC GAGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCA CCTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAG CATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTAC CTGAAGCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 124)	EMQLQESGPGLVKPSETLSL TCSVTGDSMTNGYWNWIRK FPGKGLEMYGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL KLSSVTTADTATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 83)

<b>HC2a</b>	<p>GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 125)</p>	<p>EMTLKESGPTLVKPTQTL TCSVTGESMTQGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRQTSKNQYYL TLSSVTTVETATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 84)</p>
<b>HC2b</b>	<p>GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGACCGGGCGACAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGC ATCACCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGTCCAGCGTG (SEQ ID NO: 126)</p>	<p>EMTLKESGPTLVKPTQTL TCSVTGDSMTQGYWNWIRK FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRISITRNTSKNQYYL TLSSVTTVDATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 85)</p>
<b>HC3</b>	<p>CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCACC ATCACCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 127)</p>	<p>QMTLKESGPTLVKPTQTL TCSVSGDSMTNGYWNWIRQ FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRITITRDTSKNQYYL TLSSVTTVDATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 86)</p>
<b>HC4</b>	<p>CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGG TCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCAG CGTGTCCGGCGAGAGCATGACCCAGGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGGCCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCAGCCTGAAGGGCCGGATCACC ATCACCCGGCAGACCAGCAAGAACCAGTACTACC TGACCCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 128)</p>	<p>QMTLKESGPTLVKPTQTL TCSVSGESMTQGYWNWIRQ FPGKALEYMGYITYSGSTYY NPSLKGRITITRQTSKNQYYL TLSSVTTVETATYYCARWH YGSPYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 87)</p>
<b>HC5a</b>	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCAC</p>	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGDSMTNGYWNWIRQ</p>

	<p>CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCAGCCGGAACACCAGCAAGAACCAGTACAGC CTGAAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 129)</p>	<p>PPKGLEYMGYITYSGSTYY NPSLKSRTISRNTSKNQYSL KLSSVTAADTAVYYCARWH YGSPYYFDYWGQGLVTVS S (SEQ ID NO: 88)</p>
<b>HC5b</b>	<p>CAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCAC CGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACC ATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACAGC CTGAAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 130)</p>	<p>QMQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGDSMTNGYWNWIRQ PPKGLEYMGYITYSGSTYY NPSLKSRTISRNTSKNQYSL KLSSVTAADTAVYYCARWH YGSPYYFDYWGQGLVTVS S (SEQ ID NO: 89)</p>
<b>HC5c</b>	<p>CAGATGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCCTGG TCAAACCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGC CATCAGCGGCGACAGCATGACCAACGGCTACTGG AACTGGATCCGGCAGAGCCCCAGCAGAGGCCTCG AGTACATGGGCTACATCACCTACAGCGGCAGCAC CTACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGGATCACC ATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACAGC CTGCAGCTGAGCAGCGTG (SEQ ID NO: 131)</p>	<p>QMQLQQSGPGLVKPSQTL TCAISGDSMTNGYWNWIRQ SPSRGLEYMGYITYSGSTYY AVSVKSRITINRDTSKNQYSL QLSSVTPEDTAVYYCARWH YGSPYYFDYWGQGLVTVS S (SEQ ID NO: 90)</p>
<b>LC1a</b>	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO: 132)</p>	<p>DIKMTQSPSSLSASVGDRV TCKASQDINSYLSWLQKPG KSPKTLIYRANRSVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLQPEDL GIYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 91)</p>
<b>LC1b</b>	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCGTGT CCGTGTCTCTGGCCAGACCGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGA CCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACGG CGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGGC CAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGG CCATGGACGAGGGCATC (SEQ ID NO: 133)</p>	<p>DIKMTQSPSSVSVPQT TCKASQDINSYLSWLQKPG QSPKTLIYRANRSVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLQAMD EGIYYCLQYDEFPPTFGGGT KLTIK (SEQ ID NO: 92)</p>

<b>LC2</b>	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGCGTGGAAG GCGTGCCAAGCAGATTTCAGCGGCAGCGGCTCCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGGCATC (SEQ ID NO: 134)</p>	<p>DIKMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KSPKTLIYRAQRSVEGVPSRF SGSGSGQDYSLTISLQPEDL GIYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 93)</p>
<b>LC3</b>	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGAGCG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO: 135)</p>	<p>DIKMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KSPKTLIYRANRSVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISLQPEDL ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 94)</p>
<b>LC4</b>	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGAGCGTGGAAG GCGTGCCAAGCAGATTTCAGCGGCAGCGGCTCCGG CCAGGACTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGACCTGGCCACC (SEQ ID NO: 136)</p>	<p>DIKMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KSPKTLIYRAQRSVEGVPSRF SGSGSGQDYSLTISLQPEDL ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 95)</p>
<b>LC5a</b>	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAG CTGCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGAGCG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGG CACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO: 137)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KAPKLLIYRANRSVDGVPSR FSGSGSGTDYFTTISLQPEDL ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 96)</p>
<b>LC5b</b>		<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQDINSYLSWLQQKPG KAPKTLIYRANRSVDGVPSR FSGSGSGQDYFTTISLQPEDL ATYYCLQYDEFPPTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 97)</p>

	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAG ACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCAGCGTGGACG GCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCGG CCAGGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAG CCCGAGGATATCGCCACC (SEQ ID NO: 138)	
<b>LC5c</b>	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGT CTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTG CAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGC TGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGA ACCCTGATCTACCGGGCCAACAGAAGCGTGGACG GCATCCCCGCCAGATTGAGCGGCAGCGGCTCCGG CCAGGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAA CCCGAGGACTTCGCCGTG (SEQ ID NO: 139)	EIVMTQSPATLSLSPGERATL SCKASQDINSYLSWLQQKPG QAPRTLIIYRANRSVDGIPARF SGSGSGQDYTLTISSLEPEDF AVYYCLQYDEFPPTFGGGTK VEIK (SEQ ID NO: 98)
	<b>Proteína</b>	
<b>CH</b>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV	
	YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF (SEQ ID NO: 99)	
<b>CL</b>	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 100)	

Todas las variantes, excepto las variantes 3 y 10 expresadas deficientemente, se estudiaron en Biacore frente a PAI-1 humano y de macaco y frente al complejo de vitronectina-PAI-1. El dato se presenta en la Tabla 26.

Tabla 26: Caracterización de variantes de humanización en un Biacore

<b>Chip de vitronectinación / PAI-1 humano</b>			
<b>mAb/hPAI-1/Vn</b>	<b>ka1 (1/Ms)</b>	<b>kd 1 (1/s)</b>	<b>KD (M)</b>
<b>A44 parental *</b>	5,68E+06	2,29E-04	4,04E-11
<b>A44-hv1*</b>	1,10E+07	5,55E-04	5,26E-11

# ES 2 770 507 T3

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

<b>Chip de anti-Fc de IgG humano / PAI-1 humano</b>			
<b>mAb/hPAI-1*</b>	<b>ka1 (1/Ms)</b>	<b>Kd 1 (1/s)</b>	<b>KD (M)</b>
<b>A44-hv11/hPAI-1</b>	1,57E+06	6,68E-05	4,25E-11
<b>A44-hv12/hPAI-1</b>	1,62E+06	6,70E-05	4,14E-11
<b>A44-hv13/hPAI-1</b>	1,54E+06	2,52E-05	1,64E-11
<b>A44-hv14/hPAI-1</b>	1,25E+06	3,42E-05	2,70E-11

Chip de anti-Fc de IgG humano / PAI-1 de macaco			
mAb/cPAI-1*	ka1 (1/Ms)	kd 1 (1/s)	KD (M)
<b>A44-hv11/hPAI-1</b>	1,87E+06	5,60E-05	3,00E-11
<b>A44-hv12/hPAI-1</b>	2,24E+06	5,45E-05	2,44E-11
<b>A44-hv13/hPAI-1</b>	1,89E+06	5,08E-05	2,70E-11
<b>A44-hv14/hPAI-1</b>	2,32E+06	2,69E-05	1,15E-11
n/a significa que la variante no se unió eficazmente al complejo de vitronectina/PAI-1			
*modelo de interacción molecular 1:1			
**modelo de reacción de dos estados (cambio de conformación)			

El dato de Biacore no reveló diferencias significativas entre las variantes humanizadas. Todas las variantes humanizadas, excepto la variante 8, mostraron afinidad tanto por PAI-1 de macaco como por PAI-1 humano y por PAI-1 complejado con vitronectina, dentro de un intervalo aceptable. En comparación con A44 parental, parece que la humanización no cambió la afinidad del anticuerpo.

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

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

mAb	Activación del plasminógeno		
	IC50 (nM)	Y50%	n
<b>A44</b>	3,13	79,79	6
<b>A44-hv11</b>	2,01	85,82	6
<b>A44-hv12</b>	1,99	76,70	6
<b>A44-hv13</b>	1,82	71,10	6
<b>A44-hv14</b>	1,82	61,22	6
<b>A44-hv9</b>	1,51	50,92	4
<b>A44-hv1</b>	2,08	58,50	2

Las variantes 11 a 14 mostraron una buena potencia en el ensayo de generación de plasmina, y se caracterizaron adicionalmente en ensayos in vitro adicionales.

#### 8) Caracterización de variantes de humanización en hígado humano

Se llevó a cabo un cribado adicional de las variantes 11-14 humanizadas usando PAI-1 humano producido endógenamente a partir de plasma humano y muestras de hígado fibrótico humano.

La actividad PAI-1 se evaluó midiendo la capacidad de esta serpina para formar un complejo estable con urocinasa inmovilizada en placas de 96 pocillos. Tras lavar PAI-1 no unido, los complejos de uPA-PAI-1 se detectaron mediante el uso de anticuerpos policlonales antiPAI-1. Los anticuerpos policlonales unidos anti-PAI-1 (que son proporcionales a PAI-1 activo en la muestra) se detectaron entonces usando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (nº de Cat. de Molecular Innovation HPAIKT). Diversas concentraciones de variantes humanizadas de A44 se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con PAI-1 recombinante

humano o de de macaco (concentración final 0,31 nM), y entonces se estudiaron para determinar PAI-1 activo funcional mediante el complejo de uPA-PAI-1 usando el ELISA descrito anteriormente. Las muestras se compararon con el patrón de PAI-1 humano. El plasma humano procedente de pacientes con un IMC elevado con niveles de PAI-1 activo elevados se diluyó 4 veces, y se incubó con cantidades crecientes de variantes humanizadas de A44. Los niveles de PAI-1 activo que quedan se determinaron usando detección del complejo de uPA-PAI-1 mediante ELISA. También se estudió La neutralización de PAI-1 recombinante de macaco mediante generación de plasmina, para confirmar la reactividad cruzada.

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

Patrón de hPAI-1			TH1782 plasma humano				PAI-1 de macaco		
IC50(nM)	Y50%	n	mAb	IC50(nM)	Y50%	N	IC50(nM)	Y50%	n
1,31E-01	50,80	2	<b>A44-hv11</b>	1,57E-02	37,50	2	4,24E-02	50,80	2
1,14E-01	53,45	2	<b>A44-hv12</b>	3,35E-03	37,68	2	2,66E-02	53,45	2
1,66E-01	52,82	2	<b>A44-hv13</b>	3,11E-02	61,35	2	2,81E-02	52,82	2
5,63E-02	52,47	2	<b>A44-hv14</b>	5,86E-02	73,90	2	2,87E-02	52,47	2

Muestras de hígado fibrótico humano (proporcionadas por Biopredic International, Rennes, Francia, procedentes de la resección quirúrgica de metástasis de colon hepática) se homogeneizaron como sigue: muestras de hígado congeladas pesadas se homogeneizaron en tubos secos que contienen perlas cerámicas (nº de Cat 03961-1-003, Bertin Technology, Francia) usando el homogeneizador Precellys (Bertin Technology, Francia; 4°C, 2x30 segundos a 6800 rpm), y entonces se disolvieron usando 1 ml/g de amortiguador de lisis (NaCl 1,5M en TBS – Disolución de Amortiguador Tris 0,1M de Tris + 0,15M de NaCl pH 7,4). Tras centrifugar a 4°C a 5000 g durante 10 min, el lisado hepático en el sobrenadante se recogió y se almacenó congelado a -80°C. La concentración de proteína total usando el ensayo estándar de BCA y los niveles de PAI-1 activo y total (determinados mediante ELISA del complejo UK-PAI proporcionado por el nº de Cat HPAIKT y el nº de Cat MPAIKT-TOT Mol Innov) se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante representando gráficamente la concentración de PAI-1 humano estándar frente a A450nm usando el software Biostat Calibration. Concentraciones crecientes de variantes humanizadas de A44, incubadas con lisado hepático diluido hasta 2,5 nM de PAI-1 activo, se evaluaron como se describió previamente, y se analizaron los datos. La inhibición de la actividad de PAI-1 (actividad de PAI-1 sin mAb, que es una inhibición de 0%; no se produjo inhibición significativa ni dependiente de la dosis de PAI-1 con IgG1) se calculó para cada concentración de mAb. El porcentaje de inhibición de la actividad de PAI-1 se representó gráficamente como una función de la concentración de mAb, y la IC50 se determinó y la Imax usando el software de Biostat speed. El dato se muestra en la Figura 17 y en la Tabla 29.

Tabla 29: Neutralización de la actividad de PAI-1 mediante A44-hv11 en hígado humano

	IC50 (nM)	Imax (%)
<b>A44-hv11 (1 nM)</b>	0,0365	99,997
<b>A44-hv11 (2 nM)</b>	0,0503	99,99
<b>A44-hv11 (3 nM)</b>	0,0465	99,99
<b>Media +/- sem</b>	0,0444 +/- 0,004	99,99

En base al dato anterior, A44-hv11 se seleccionó para una caracterización posterior en estudios estructurales adicionales y en estudios in vitro e in vivo adicionales.

### Ejemplo 13: Humanización de anticuerpo APG mediante injerto

Se ha dado a conocer previamente la humanización usando técnicas de injerto (P. T. Jones, et al., Nature 1986, 321:522-525). La humanización del anticuerpo murino APG anti-PAI1 comenzó con la cadena ligera murina (SEQ ID NO: 148) y la cadena pesada murina (SEQ ID NO: 149) de la solicitud de patente alemana nº DE2000153251; este anticuerpo murino también se describe en Debrock et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1337(2):257-266 (1997). La identificación de la línea germinal y clases canónicas de la cadena HC y LC del anticuerpo murino produjo muIGHV1-39 y muIGKV14-111, respectivamente. A continuación, se identificó la lista de líneas germinales humanas próximas a las cadenas ligera y pesada del dominio variable de APG anti-PAI1, y se clasificó por porcentaje de

identidad. Ambas etapas se realizaron llevando a cabo una búsqueda BLAST frente a todas las líneas germinales humanas que se enumeraron sistemáticamente (todas las posibles combinaciones de los dominios V y J para las cadenas kappa y lambda; dominios V, D y J para las cadenas pesadas). Las búsquedas BLAST se llevaron a cabo usando la herramienta IMGT/DomainGapAlign proporcionada en <http://www.imgt.org>. (véase Ehrenmann, et al. Cold Spring Harbor Protocols 2011.6 (2011)). Las líneas germinales humanas más próximas se identificaron con una identidad de secuencia de 67,4% y 63,3% con respecto a las cadenas ligera y pesada del dominio variable de APG anti-PAI1, respectivamente. Usando la base de datos de IMGT, se encontró que la cadena ligera estaba próxima a HulIGKV1-33, y la cadena pesada estaba próxima a HulIGHV1-46. Se encontró que la línea germinal humana más próxima a la cadena pesada del dominio variable de APG anti-PAI1, con una clase canónica coincidente, es HulIGHV7-4-1, con una identidad de secuencia de 62,2%.

Las regiones CDR (en base a una combinación de Kabat e IMGT para APG) y los restos Vernier se indican en cursiva para la cadena ligera de APG murino (mAPG) parental (SEQ ID NO: 148), IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 (IGKV1a) (SEQ ID NO: 107) y para IGKV1-33-01\_IGKJ2-02 (IGKV1b) (SEQ ID NO: 150) (véase la Tabla 30, más abajo). Los restos Vernier, como se identifican en Foote, et al. J. Mol. Biol. 224(2):487-99 (1992), están subrayados. Las mutaciones humanizantes (en negrita) se obtuvieron llevando a cabo una comparación por parejas de las dos secuencias alineadas, excluyendo la CDR y los restos de zona Vernier (también subrayados en las secuencias de mAPG, Tabla 30) como se define anteriormente. No se llevó a cabo ninguna modificación adicional en el anticuerpo APG murino. Estos anticuerpos humanizados se denominaron APGv2 y APGv4.

Tabla 30: Secuencias de humanización de APG

Cadena ligera de APG	<p><i>DIKLTQSPSS MYASLGERVT ITCASQDIY SYLSWFQQKP GKSPKTLIYR</i>  <i>ANRLIDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EHMGIYYCLQ YDEFPFTFGS</i>            GTKLEIK</p> <p>(SEQ ID NO: 148)</p>
Cadena pesada de APG	<p><i>QIKLQESGPE LVKPGASVKI SCKASGYSET DYNMNWVKQS KGKSLEWIGI</i>  <i>IHPNSGTTY NQKFKGKATL TIDQSSSTAY LQLNSLTSED SAVYYCARSK</i>            LRFFDYWGQG TTVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 149)</p>
IGKV1-33-01_IGKJ4-01 (IGKV1a)	<p><b>DIQMTQSPSS LSASVGD</b>RVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK<b>APKLLI</b>YD            ASNLETGVPS RFSGSGSGTD <b>FTFTIS</b>L<b>QP</b> EDIATYYCQQ YDNLPLTFGG            GTK<b>VEIK</b></p> <p>(SEQ ID NO: 107)</p>
IGKV1-33-01_IGKJ2-02 (IGKV1b)	<p><b>DIQMTQSPSS LSASVGD</b>RVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GK<b>APKLLI</b>YD            ASNLETGVPS RFSGSGSGTD <b>FTFTIS</b>L<b>QP</b> EDIATYYCQQ YDNL<b>PCSFGQ</b>            GTKLEIK</p> <p>(SEQ ID NO: 150)</p>
IGHV7-4-1-02_IGHJ4-03	

	<p>QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWM GWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARx xxxYFDYWGQGLTVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 151)</p>
IGHV1-46-01_IGHJ4-03	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWM GIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARxx xxxYFDYWGQGLTVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 152)</p>
APGv2_VL2	<p>D<del>I</del>QLTQSPSS LSASVGD<del>R</del>VT ITCKASQDIY SYLSWFQQKP GKAPKTLIYR AN RLIDGVPS RFSGSGSGQD YTF<del>T</del>ISSLQP EDIATYYC LQ YDEFPFT FGQ GTKLEIK</p> <p>(SEQ ID NO: 153)</p>
APGv2_VH2	<p>QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKAS GYSET DYN MNWVRQA PGQGLEWIGI IHPNSGTTY NQKFKGRAVLSDQSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCARSK LRFFDYWGQG TLTVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 154)</p>
APGv4_VH4	<p>QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS GYSET DYN MNWVRQA PGQGLEWI GI IHPNSGTT TY NQKFKGRATL TVDQSTSTAY MELSSLRSED TAVYYC ARSK LRFFDY WGQG TLTVTVSS</p> <p>(SEQ ID NO: 155)</p>

#### Secuencias manipuladas

Se aplicaron enfoques de humanización 4D y de injerto a las coincidencias de las secuencias de línea germinal humana descritas anteriormente. Para las secuencias de cadena ligera manipuladas, APGv2 contiene las CDRs de cadena ligera murinas injertadas en la línea germinal IGKV1-33 humana (índice de germinalidad de APGv2 = 94% con IGKV1-33-01\_IGKJ2-01). Para las secuencias de cadena pesada manipuladas, APGv2 y APGv4 contienen las CDRs de cadena pesada murinas injertadas en las líneas germinales humanas IGHV7-4-1 e IGHV1-46, respectivamente (índice de germinalidad de APG\_VH2 = 91% con IGHV7-4-1-02\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02; índice de germinalidad de APG\_VH4 = 91% con IGHV1-46-01\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02). Véase la Tabla 30 anteriormente.

#### 10 Combinaciones de secuencias de variantes de cadena pesada y ligera

Para el injerto, se creó una versión de la cadena ligera (APGv2\_VL2; SEQ ID NO: 153) y dos versiones de la cadena pesada (APGv2\_VH2; SEQ ID NO: 154 y APGv4\_VH4; SEQ ID NO: 155). APG\_VL2 contiene 15 mutaciones derivadas del injerto a la secuencia de línea germinal humana más próxima y que retienen los restos de CDR murina y de la zona Vernier. APG\_VH2 contiene 21 mutaciones derivadas del injerto a la secuencia de línea germinal humana más próxima con una clase canónica coincidente y que retienen los restos de CDR murina y de la zona

Vernier. APG\_VH4 contiene 20 mutaciones derivadas del injerto a la secuencia de línea germinal humana más próxima y que retienen los restos de la CDR murina y de la zona Vernier. Las delimitaciones de las CDRs para este protocolo de injerto se basan en líneas generales en las diversas definiciones diferentes disponibles en la bibliografía.

- 5                   •       APG\_VL2 x APG\_VH2 (mutaciones que abordan la humanización mediante injerto que retienen CDRs y regiones Vernier)
- APG\_VL2 x APG\_VH4 (mutaciones que abordan la humanización mediante injerto que retienen CDRs y regiones Vernier)

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

#### **Ejemplo 14: Cinética de afinidad para anticuerpos APG mediante resonancia de plasmones superficiales**

Se investigó la afinidad a PAI-1 glicosilado humano (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) para APG de ratón y las dos variantes humanizadas (APGv2 y APGv4), usando un instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

15           En primer lugar, la superficie de un chip sensor CM5 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) se preparó usando acoplamiento amínico habitual, para la captura del anti-Fc de ratón y humano (kits de anticuerpo anti-IgG (Fc) humana y anticuerpo anti-IgG de ratón, GE Healthcare). Todos los anticuerpos monoclonales (mAbs) se diluyeron hasta 5 nM usando amortiguador de ejecución HBS-EP. Cada mAb purificado se capturó durante tres minutos sobre una superficie diferente de la celda de flujo. Se inyectó PAI-1 humano a diversas concentraciones (2,5, 5, 10, 20 y 40 nM), con tiempos cortos de disociación entre medias y un tiempo de disociación prolongado al final (tiempo de contacto: 120 segundos, disociación corta: 90 segundos; disociación larga: 1800 segundos, caudal: 50 µl/min). El chip se regeneró mediante amortiguador de glicina-HCl, pH 1,7, después de cada ronda de unión de anticuerpo con PAI-1. El análisis de los datos cinéticos se llevó a cabo usando el software BIAevaluation de Biacore. Los sensogramas se referenciaron doblemente restando los valores de la celda de flujo de referencia y los valores del amortiguador del blanco. Los sensogramas se ajustaron usando el modelo de cinética simulada 1:1 (Langmuir) con Rmax local (véase la Figura 19). En la Tabla 31 se muestran los datos para los tres anticuerpos APG.

Tabla 31: Cinética de unión mediante ensayo inverso de Biacore

Anticuerpo	PAI-1 humano		
	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Constante de disociación kd (1/s)	Afinidad KD (M)
APG	3,82E+06	4,32E-04	1,131E-10
APGv2	6,58E+06	2,69E-04	4,080E-11
APGv4	9,48E+06	3,59E-04	3,800E-11

#### **Ejemplo 15: Caracterización de anticuerpos APG en plasma humano**

30           El APG de ratón y las variantes humanizadas APGv2 y APGv4 se cribaron para determinar su capacidad para bloquear PAI-1 según los ensayos funcionales descritos aquí (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 6 y 9, anteriormente). De forma breve, la actividad de PAI-1 se evaluó mediante la capacidad de esta serpina para formar un complejo estable con urocinasa inmovilizada sobre placas de 96 pocillos. Tras lavar PAI-1 no unido, los complejos de uPA-PAI-1 se detectaron mediante el uso de anticuerpos policlonales antiPAI-1. Los anticuerpos policlonales unidos anti-PAI-1 (que es proporcional a PAI-1 activo en la muestra) se detectaron entonces usando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante, según las instrucciones del fabricante (Molecular Innovation, nº de Cat HPAIKT).

40           Diversas concentraciones de variantes humanizadas de APG (APGv2, APGv4) o de anticuerpos APG de ratón parentales se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con plasma humano sin diluir que tiene un nivel elevado de PAI-1 activo. El nivel de PAI-1 activo que queda se determinó usando la detección del complejo de uPA-PAI-1 mediante ELISA como se describe anteriormente (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6) y según la instrucción del fabricante.

45           La inhibición de la actividad de PAI-1 se calculó para cada concentración de mAb. El porcentaje de inhibición de la actividad de PAI-1 se representó gráficamente como una función de la concentración de las variantes humanizadas de APG (APGv2, APGv4) o de anticuerpo APG de ratón parental. Se usó el software Biostat speed para determinar

IC<sub>50</sub> e I<sub>max</sub> después de tres experimentos independientes (por duplicado) (véase la Figura 20). El dato se presenta a continuación en la Tabla 32.

Tabla 32: Generación de plasminógeno en plasma humano

Anticuerpo	IC <sub>50abs</sub> media ± sem (nM)	I <sub>max</sub> media (%)
mAPG	1,81	89,7
APGv2	9,62 E-1	94,5
APGv4	1,28	94,4

#### 5 Ejemplo 16: Ensayo de lisis del coágulo en plasma humano: actividad de A44V11, mAPG, y de las variantes de APG

El sistema fibrinolítico se altera a menudo en pacientes con accidente cerebrovascular. Se puede usar un ensayo de lisis del coágulo para determinar la actividad fibrinolítica midiendo el grado de ruptura de fibrina. Véase generalmente, Lindgren, A. et al. Stroke 27:1066-1071 (1996). Los ensayos de lisis del coágulo se han descrito con detalle en otra parte. Véanse, por ejemplo, Beebe, et al. Thromb. Res. 47:123-8 (1987); Tilley et al., J. Vis. Exp. 67:e3822.

La actividad funcional de A44V11 y de otros anticuerpos neutralizantes de PAI-1 se determinó usando el ensayo de lisis del coágulo de plasma humano. De forma breve, el ensayo aplicado aquí induce la formación de coágulo usando una mezcla de Factor tisular/Ca<sup>2+</sup> en presencia de tPA y una concentración de PAI-1 que se sabe que inhibe la lisis del coágulo. La polimerización de la fibrina induce un incremento en la turbidimetría, que se detectó mediante medida de la absorbancia a 340 nm. La capacidad del anticuerpo para restaurar la lisis del coágulo se determinó incubando dosis crecientes de anticuerpo con plasma humano normal pobre en plaquetas.

De forma breve, los experimentos de lisis del coágulo se llevaron a cabo en placas de microtitulación. Se incubó plasma humano citrado (Biopredic International, Rennes, Francia) con anticuerpo anti-PAI-1 o con IgG de control de isotipo diluido en amortiguador de ensayo (NaCl, Tris-HCl pH = 7,4). Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió PAI-1 glicosilado humano (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) hasta una concentración final de 3 nM, y se incubó durante 10 min adicionales. Entonces se añadió t-PA (sctPA, Molecular Innovation) hasta una concentración final de 1 nM. La formación del coágulo se indujo mediante una mezcla de activación que comprende Factor Tisular Innovin®, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) diluido hasta una concentración final de 7,5 mM en amortiguador de ensayo de calcio (CaCl<sub>2</sub>).

La lectura cinética de la absorbancia a 340 nm se llevó a cabo cada 30 s durante 5 horas con un lector de microplacas iEMS (ThermoFischer) o un SpectrostarNano (BMG Labtech). Para cuantificar el efecto sobre la lisis del coágulo, se calculó el área bajo la curva (AUC), que refleja el equilibrio entre la formación del coágulo y la lisis del coágulo, usando el software GraphPad Prism. La restauración de la lisis del coágulo tras el tratamiento con el anticuerpo se determinó según el siguiente cálculo:

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

IC<sub>50</sub> e I<sub>max</sub> se calcularon usando el software Biostat speed.

La concentración de 1 nM de t-PA produjo lisis total de plasma normal en 2 horas. La concentración de 3 nM de PAI-1 inhibió la lisis del coágulo inducida por t-PA. La adición de t-PA o de PAI-1 solos no afectó la formación del coágulo. La falta de adición de t-PA o de PAI-1 no afectó la formación del coágulo.

El anticuerpo A44V11 anti-PAI-1 restauró la lisis del coágulo de plasma humano pobre en plaquetas (véase la Figura 21), mientras que el isotipo IgG1 no lo hizo (véase la Figura 22). A44V11 mostró una IC<sub>50</sub> de 2 nM con una I<sub>max</sub> de 103% a 100 nM (véase la Figura 23).

Las variantes humanizadas del anticuerpo APG anti-PAI-1 también restauró la lisis del coágulo de plasma humano pobre en plaquetas (véase la Figura 24). APGv2 mostró una IC<sub>50</sub> de 2,1 nM y una I<sub>max</sub> de 114% a 100 nM. APGv4 mostró una IC<sub>50</sub> de 2,8 nM y una I<sub>max</sub> de 116% a 100 nM (véase la Figura 25). El dato de la lisis del coágulo se resume a continuación en la Tabla 33.

Tabla 33: Inhibición de la lisis del coágulo mediante anticuerpos anti-PAI-1

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> (nM)	I <sub>max</sub> @ 100 nM
A44V11	1,38	113%
APG V2	2,08	114%
APG V4	2,82	116%
mAPG	2,34	123%

**Ejemplo 17: Evaluación de la neutralización de PAI-1 por A44V11 en células pulmonares humanas primarias**

Se investigó el efecto del anticuerpo A44V11 sobre la neutralización de PAI-1 en un sistema a base de células pulmonares. TGF $\beta$  es considerado la citocina profibrogénica más potente y ubicua. Se ha mostrado que TGF $\beta$  induce la expresión de PAI-1 e inhibe las actividades de t-PA y de plasmina, así como la degradación de colágeno en fibroblastos embrionarios murinos cultivados (células NIH3T3). Véase Liu, R-M. Antioxid Redox Signal. 10(2): 303-319 (2008). Las cepas de fibroblastos pulmonares primarios LL29 (CCL-134) y LL97A (CCL-191) de ATCC (Manassas, Virginia) se sembraron toda la noche en una placa de 12 pocillos a una concentración de 200.000 células por pocillo. Las células se incubaron durante 48 horas con anticuerpo A44V11 o con control de isotipo (IgG) y TGF $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, Minn., n° de cat. 100-B-001) a una concentración de 5 ng/ml. Después de 48 horas, los sobrenadantes celulares se recolectaron y se analizaron mediante transferencia Western para la detección de las formas de PAI-1 con pAb de conejo anti PAI-1 (abcam, ab66705).

Las células tratadas con anticuerpo A44V11 tras la estimulación con TGF $\beta$  presentan una banda de PAI-1 como un doblete, que corresponde a la forma escindida de PAI-1 (véase la Figura 26, línea 5). Las células tratadas con el control IgG no mostraron esta formación del doblete (véase la Figura 26, línea 6). Este estudio demuestra que el tratamiento de células pulmonares humanas primarias con A44V11 induce conformación de sustrato de PAI-1 endógeno, que permite que PAI-1 sea escindido por proteasa.

**Ejemplo 18: A44V11 aumenta la activación de las MMPs**

La plasmina puede activar las MMPs, enzimas que pueden degradar la mayoría de las proteínas de la ECM, incluyendo colágeno, el componente proteínico principal del tejido fibrótico. A este respecto, a menudo, la plasmina se cita como un activador general de las MMPs. (Véase Loskutoff, et al. J. Clin. Invest. 106(12):1441-43 (2000)). PAI-1 disminuye la activación de las MMPs y la degradación de la matriz al bloquear la generación de plasmina, seguido de la inhibición de la apoptosis de los fibroblastos. Se investigó la capacidad de A44v11 para estimular la activación de las MMPs en un sistema a base de células del pulmón. Fibroblastos pulmonares primarios LL29 (CCL-134) y LL97A (CCL-191) de ATCC (Manassas, Virginia) se sembraron toda la noche en una placa de 12 pocillos a una concentración de 250.000 células por pocillo. Las células se incubaron durante 48 horas con A44V11 o con control de isotipo (IgG) y Lys-Plasminogen (Molecular Innovation, n° de cat. HGPG-712) a una concentración de 0,1  $\mu$ M. Después de 48 horas, los sobrenadantes celulares se cosecharon, y las actividades de una variedad de MMPs (incluyendo, por ejemplo, MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 y 14) se detectaron usando un kit de ensayo de MMP genérico Sensolyte 520 (AnaSpec, Fremont, CA, n° de cat. 71158) según las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en la Figura 27, A44V11 estimula la activación de las MMPs dependientes de plasmina en fibroblastos pulmonares humanos. La gráfica muestra dos experimentos distintos representativos. Las células tratadas con A44V11 y plasminógeno mostraron una activación sustancialmente incrementada cuando se comparan con células tratadas con un anticuerpo IgG1 negativo. Este estudio demuestra que A44V11 estimula la activación de las MMPs en un fenómeno mediado por plasmina.

**Ejemplo 19: Análisis de la potencia de A44V11 en modelo de ratón con fibrosis pulmonar (exposición a bleomicina)**

La fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina es un modelo bien estudiado de fibrogenesis apoyado por una amplia bibliografía. Este modelo de fibrosis pulmonar se asemeja al observado en seres humanos, y se ha usado para evaluar los efectos de agentes terapéuticos potenciales así como investigación básica (véase, por ejemplo, Molina-Molina et al. Thorax 61: 604-610 (2006)).

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

Se generaron ratones transgénicos que expresan PAI-1 humano (ratones transgénicos con PAI-1 humanizado) sustituyendo la CDS (exones e intrones) del gen de PAI-1 (SERPINE1) de ratón (NCBI Ref. n° NM\_008871) por la CDS del gen de PAI-1 de tipo salvaje humano correspondiente (NCBI Ref. n° NM\_000602.3; NC\_000007.13) (véase Klinger, K.W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8548 (1987)) bajo el control de las secuencias reguladoras del gen

de PAI-1 de ratón endógenas en ratones C57BL/6 x 129 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). La clonación molecular y la generación de ratones transgénicos se lleva a cabo según técnicas convencionales y según las instrucciones del fabricante y del criador. La expresión de PAI-1 humano y la no expresión de PAI-1 de ratón se confirmó en ratones homocigotos. Los niveles tanto de ARNm como de proteína se confirmaron mediante qPCR estándar y mediante ELISA, respectivamente. Para estos procedimientos, se usaron ratones hembra transgénicos con PAI-1 humanizado homocigotos de 8-9 semanas y que pesan 22-25 g. A los roedores se les proporcionó alimento y agua a voluntad.

Los ratones recibieron 50 µl de Bleomycin® (Sanofi, Francia) disuelta en 0,9% de NaCl mediante inyección intratraqueal vía un Microspayer, a una dosis de 2 mg/kg. Los ratones del control recibieron 50 µl de 0,9% de NaCl. Para estos procedimientos, los ratones se anestesiaron con isoflurano (TEM, Lormont, Francia) mediante inhalación, y después se intubaron con una cánula de 18G. La cánula se conectó a un ventilador alimentado con una mezcla de oxígeno/isoflurano, para mantener la anestesia. Tras la aplicación de la anestesia, el Microsprayer se introdujo en la cánula para la inyección de bleomicina directamente en los pulmones. Los ratones se extubaron y se dejaron recuperar de la anestesia. En el día 4, tras la distribución aleatoria en 3 grupos, los ratones se trataron una vez mediante administración intraperitoneal de A44v11 o IgG1 de ratón como control negativo, a 10 mg/kg en PBS (1 mg/ml).

En los puntos de tiempo designados (día 7 o día 9) tras la exposición a la bleomicina, los ratones se anestesiaron con una mezcla de xilazina/cetamina, y se eutanasiaron mediante apertura del pecho. Se llevó a cabo una recogida de la sangre mediante recolección intracardíaca en un tubo revestido con citrato. El bronquio izquierdo se pinzó, y el pulmón izquierdo se retiró y se fijó con un fijador (FineFix®, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) a presión controlada para el análisis histológico. Entonces se colocó una cánula en la tráquea para el procedimiento de lavado broncoalveolar (BAL) (1,5 ml de 0,9% de NaCl inyectado y recogido en tres inyecciones de 0,5 ml). Entonces se recogieron los cuatro lóbulos del pulmón derecho, se cortaron en dos trozos y se lisaron para el análisis proteico. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las leyes éticas europeas, y fueron aprobados por un comité ético interno (CEPAL, sanofi).

Los niveles de A44V11 se determinaron usando ELISA (Molecular Innovation, nº de cat. HPAIKT) con placas de PAI-1 humano biotinilado revestidas, y se detectaron usando anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con sulfo-tag (MesoScale Discovery, Gaithersburg, Maryland). Para los ratones del Día 7 tratados con A44V11, el resultado fue 200 nM en plasma, 11 nM en BALF, y 12 nM en el lisado pulmonar.

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

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

Se llevaron a cabo estudios adicionales para evaluar además la actividad de A44V11 en la reducción de la fibrosis en pulmón de ratón expuesto a bleomicina. Para estos estudios, los ratones se sometieron a un protocolo similar al estudio farmacodinámico descrito anteriormente, excepto que la duración del estudio fue 21 días desde la exposición a bleomicina, y el tratamiento con anticuerpo (ya sea anticuerpo A44V11 o de control IgG1, a 10 mg/kg) se repitió cada 3 días comenzando en el día 4 hasta el día 20. En el día 21 tras la exposición a bleomicina, los animales se sacrificaron como se describió anteriormente.

Se sabe que un incremento en el peso pulmonar es un indicador de aumento de fibrosis. Se determinó el peso del pulmón derecho, como una medida de la fibrosis, para los ratones en todos los grupos experimentales. Como se muestra en la Figura 30, la instilación de bleomicina induce un incremento en el peso del pulmón derecho, que se inhibió parcialmente dosificando de forma repetida anticuerpo A44V11 a 10 mg/kg. La dosificación repetida usando el anticuerpo de control negativo IgG1 no inhibió el incremento en el peso del pulmón derecho debido a la exposición a bleomicina. La reducción en el incremento del peso del pulmón derecho inducido por bleomicina en ratones tratados con A44V11 fue estadísticamente significativa cuando se comparó con ratones similares inducidos con bleomicina que se trataron con el anticuerpo de control negativo IgG1 ( $p < 0,001$ ). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Newman-Keuls. Este resultado indica que A44V11 inhibe la fibrosis inducida por bleomicina en el pulmón de ratón con PAI-1 humanizado, mientras que un anticuerpo IgG1 de control no lo hace.

La acumulación de colágeno en el pulmón es otro indicador conocido de fibrosis. Para evaluar la acumulación de colágeno, se prepararon tejidos pulmonares procedentes de ratones sacrificados en el día 21, y se separaron

mediante HPLC, seguido de la medida de hidroxiprolina. Esta técnica se detalla en otra parte, por ejemplo en Hattori, et al. J Clin Invest. 106(11):1341-1350 (2000). Brevemente, se preparó tejido pulmonar mediante hidrólisis en condición ácida (HCl 6 M) durante 22 horas a 105°C, seguido de la evaporación. Las aminas primarias se bloquearon en el tejido pulmonar mediante OPA (ftalaldehído), y las prolina/hidroxiprolinas se marcaron específicamente usando NBD (4-cloro-7-nitrobenzofurazano) (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA). Los hidrolizados se separaron entonces en columnas Synergi™ 4 µm Hydro-RP 80 Å, LC Column 150 x 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, nº de cat. 00F-4375-Y0) usando HPLC (Shimazu Corp., Kyoto, Japón) en gradiente de acetonitrilo. Para cuantificar el pico o los picos, se usaron como referencia curvas patrón de cantidades conocidas de hidroxiprolina. En la Figura 31 se muestra una representación de los datos cuantificados.

La acumulación de colágeno pulmonar, como se detecta mediante el contenido de hidroxiprolina, aumentó en animales expuestos a bleomicina. Este incremento en la acumulación de colágeno pulmonar se redujo estadísticamente ( $p < 0,08$ ) mediante dosificación repetida de anticuerpo A44V11 a 10 mg/kg (véase la Figura 31). La dosificación repetida usando el anticuerpo de control negativo IgG1 no inhibió el incremento en la acumulación de colágeno pulmonar debida a exposición a bleomicina. La reducción en el incremento de la acumulación de colágeno inducida por bleomicina en ratones tratados con A44V11 fue estadísticamente significativa cuando se comparó con ratones similares inducidos con bleomicina que se trataron con el anticuerpo de control negativo IgG1 ( $p < 0,05$ ). Los ratones tratados con A44V11 mostraron aproximadamente 44% menos incremento en la acumulación de colágeno que los ratones tratados con el control de IgG1.

#### **Ejemplo 20: Evaluación de la actividad de A44V11 en modelo de exposición a LPS en monos**

Se aplicó en monos un modelo de exposición a lipopolisacárido (LPS) aguda, para determinar la eficacia de A44V11 en la neutralización de PAI-1 in vivo. El modelo de exposición a LPS se describe en Hattori, et al. J Clin Invest. 106(11):1341-1350 (2000). Se evaluó la actividad de mAb A44V11 sobre PAI-1 en muestras plasmáticas y hepáticas de mono. Específicamente, el experimento se diseñó para evaluar el impacto de una dosis elevada de LPS (100 µg/kg - IV) sobre los niveles plasmáticos y tisulares de PAI-1 en el mono anestesiado tratado previamente (24 horas antes) con A44V11 (5 mg/kg, IP) o IgG1 (control negativo, 5 mg/kg, administración intraperitoneal). Los experimentos se llevaron a cabo según las leyes éticas europeas, y fue aprobados por el comité ético interno (CEPAL, sanofi).

Macaca fascicularis Cynomolgus (machos y hembras), que pesan 4 a 9 kg, se privaron de alimento durante toda la noche antes de la anestesia de larga duración (al menos 8 horas), incluyendo inducción IM con Zoletil 50 (Virbac, Taguig City, Filipinas) a 0,12 a 0,16 ml/kg, seguido de la inhalación de una mezcla gaseosa de aire/oxígeno e isoflurano (1 a 3%). La temperatura corporal de los monos se mantuvo dentro de los intervalos fisiológicos usando una almohadilla calefactora. Tras la cateterización, se administró LPS (serotipo 0127-B8) como un bolo durante 1 min en la vena cefálica accesoria, a una dosis de 100 µg/kg (0,4 ml/kg). Se tomaron muestras de sangre y muestras hepáticas en diversos puntos de tiempo. Se recolectaron muestras de sangre (en citrato/EDTA) y se centrifugaron para aislar plasma pobre en plaquetas. Las biopsias hepáticas y la necropsia terminal se almacenaron a -80°C.

Los niveles de PAI-1 activo, dímero D y plasmina-α2 antiplasmina se determinaron usando ensayos ELISA comercialmente disponibles (Mol. Innovation, nº de cat. HPAIKT; Asserachrom D-Dimer; Plasmin-A2 antiplasmin, Diagnostica Stago) según las instrucciones del fabricante.

En plasma, el nivel de PAI-1 activo disminuye desde alrededor de 30 ng/ml hasta por debajo de 10 ng/ml en todos los monos a los que se les administra A44v11. (Véase la Figura 32 (A)). No hubo ningún incremento en los niveles de PAI-1 activo tras la administración de LPS (100 ug/kg). (Véase la Figura 32(A)). Por el contrario, los monos tratados con control negativo de IgG1 muestran un fuerte incremento en los niveles de PAI-activo tras la administración de LPS, apareciendo un máximo a alrededor de 4 h (aproximadamente 50 a alrededor de 250 ng/ml). (Véase la Figura 32(B)). De este modo, el tratamiento con el control de IgG1 negativo no reduce los niveles de PAI-activo en plasma, que aumentaron fuertemente tras la administración de LPS. (Véase la Figura 32 (B)).

Se observa un fenómeno similar en lisados de biopsia hepática. Los monos que fueron tratados con mAb A44V11 no mostraron un incremento en los niveles de PAI-1-activo tras el tratamiento con LPS. (Véase la Figura 33(A)). Por el contrario, la administración de LPS indujo un fuerte incremento de PAI-1 activo (hasta 3 ng/mg) en lisados de biopsia hepática de monos tratados con el control de IgG1 negativo (véase la Figura 33(B)).

Simultáneamente a la neutralización de PAI-1, se encontró que los niveles del dímero D en monos tratados con A44V11 (véase la Figura 34(A)) son generalmente mayores que en los monos tratados con el control de IgG negativo (véase la Figura 34(B)), sugiriendo de este modo que el tratamiento con A44V11 en monos también induce un incremento de la degradación de fibrina en el plasma.

Finalmente, las muestras plasmáticas de monos tratados con A44V11 mostraron un mayor nivel de complejos de plasmina-α2 antiplasmina (PAP) cuando se compara con los niveles de PAP en monos tratados con el control de IgG negativo. (Véase la Figura 35(A) y (B)). El incremento en el complejo de PAP y en el dímero D en presencia de A44V11 indica incrementos en la generación de plasmina.

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

El efecto del tratamiento con el anticuerpo A44V11 anti-PAI-1 sobre la formación de adherencias se evaluó en un modelo de lesión quirúrgica de cuerno uterino de ratón. La aproximación del cuerno uterino de ratón y el procedimiento de electrocauterización interrumpen la superficie serosa, causan daño térmico al tejido uterino, y aproxima superficies tisulares dañadas durante el proceso de sanación, que finalmente da como resultado adherencias postquirúrgicas en 100% de animales no tratados. El modelo y el procedimiento quirúrgico se han descrito previamente en Haney A.F. et al., (1993). *Fertility and Sterility*, 60(3): 550-558.

Para estos estudios de adherencias, se usaron los ratones hembra transgénicos generados anteriormente que expresan el transgén de PAI-1 humanizado, de aproximadamente 9 semanas, que pesan aproximadamente 20 g. Cuarenta y dos ratones hembra transgénicos maduros se dividieron en dos grupos y se sometieron al procedimiento quirúrgico diseñado para crear adherencias entre los cuernos uterinos (UH), como se describe con detalle en Haney A.F. et al., (1993). De forma breve, cada animal se anestesió con isoflurano durante la cirugía según las directrices del IACUC, y se llevó a cabo una laparotomía de línea central rutinaria, aproximadamente 1,0 cm caudal al proceso xifoide. Se identificaron los UH, se aproximaron medialmente con una única sutura 7-0 Prolene (Ethicon Inc., Somerville, NJ) colocada cuidadosamente a través de la pared muscular de cada cuerno, y los cuernos se ataron inmediatamente por debajo de la unión de los oviductos en la unión uterotubal. Se tuvo cuidado de no dañar el suministro vascular ovárico. Para inducir una lesión por electrocauterio, se usó una unidad de electrocauterio bipolar (Valley Lab Surgistat, Solid state Electrosurgery Unit, Modelo nº B-20) sobre las superficies mediales de cada cuerno uterino, cubriendo un área de aproximadamente 2x6 mm. La unidad de cauterización se ajustó como sigue: voltios 100, 130 Hz, 50-60 Amps. Se usó una punta de cauterización de 3 mm de anchura, con corriente de coagulación pura en el ajuste de 3, se inició la energía, y el tejido se tocó durante 1 segundo en dos puntos de quemadura por cuerno. La incisión muscular se cerró con aguja cilíndrica 5-0 Vicryl, BV-1 (Ethicon Inc.) en un patrón de sutura continuo. La piel se cerró con aguja cilíndrica 5-0 Prolene, BV-1 (Ethicon Inc.), en un patrón de sutura de colchón horizontal.

Tras la creación de la lesión de los UH, los animales del Grupo 1 se trataron con un volumen de 0,16 ml de un anticuerpo de control de isotipo (30 mg/kg), que se aplicó a las heridas de cauterización. Los animales del Grupo 2 se trataron con un volumen de 0,16 ml de anticuerpo A44V11 (30 mg/kg) de la misma manera. Para cada grupo, los animales se eutanasiaron a 6 horas (n = 5), 72 horas (n = 4), o en el día 7 (n = 12). (Véase la Tabla 34 más abajo). Los animales que se programaron para la eutanasia a las 72 horas y Día 7 recibieron una segunda dosis de anticuerpo (30 mg/kg) inyectada intraperitonealmente (IP) 48 horas después de la cirugía.

Tabla 34: Calendario de tratamiento para estudios de lesión de cuernos uterinos

Grupo	Tratamiento	Punto de tiempo Eutanasiado	Nº de animal	Dosificación (30mg/kg)
Grupo 1	mAb de control de isotipo (0,16 ml)	6 horas	5	Tiempo 0
		72 horas	4	Tiempo 0 + 48 horas
		Día 7	12	Tiempo 0 + 48 horas
Grupo 2	mAb humanizado A44 anti-PAI-1 (0,16 ml)	6 horas	5	Tiempo 0
		72 horas	4	Tiempo 0 + 48 horas
		Día 7	12	Tiempo 0 + 48 horas
Nota: Todos los animales tuvieron el cuerno uterino aproximado mediante sutura, y tuvieron quemaduras de cauterización creadas antes del tratamiento.				

**Evaluación de la eficacia y análisis:**

Los animales se eutanasiaron en los puntos de tiempo indicados, y se evaluó la formación de adherencias. De forma breve, la longitud de los cuernos se midió desde la bifurcación uterina hasta la sutura de aproximación colocada justo debajo de los oviductos. Las dos suturas externas que rodean a los cuernos uterinos se retiraron, y la longitud de la adherencia entre los cuernos uterinos se midió con la ayuda de un microscopio, se documentó, y se anotó como presente o ausente (Sí/No). También, se registrarán cualesquiera tejidos implicados en la formación de adherencias, pero puede no incluirse en la longitud del área adherida. La distribución del porcentaje promedio de longitud adherida entre cuernos uterinos se comprobó para la normalidad usando la prueba de Shapiro-Wilk. Los grupos se compararon entre sí usando el análisis de Tukey Kramer si están distribuidos normalmente, y el análisis de la suma de rangos de Wilcoxon si no están distribuidos normalmente. En todos los casos, un valor de  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Los animales tratados con A44V11 mostraron un porcentaje

significativamente menor de la longitud de la formación de adherencias entre cuernos uterinos aproximados (véase la Tabla 35)

Tabla 35. Resultados de las medidas de las longitudes de los cuernos uterinos

Grupo	N	% de longitud de las adherencias entre los cuernos uterinos (Media $\pm$ SEM)
mAb de control de isotipo (0,16 ml)	12	84 $\pm$ 3
mAb A44V11 (0,16 ml)	11	61 $\pm$ 7* (p=0,02)
* p = estadísticamente significativo con respecto al control de isotipo mediante el análisis de suma de rangos de Wilcoxon, aproximación de Chi cuadrado		

## 5 Detección de los niveles de PAI-1-activo y de tPA

Tras la eutanasia, se recogieron para evaluación muestras de sangre (plasma), fluido intraperitoneal (IPF), y de cuerno uterino de los animales. La recogida de las muestras se llevó a cabo usando técnicas convencionales. Las muestras de plasma, IPF, y de cuerno uterino se evaluaron para determinar los niveles de PAI-1-activo y de tPA usando ELISA. (Kits de ELISA para actividad de PAI-1 humano, nº de cat. HPAIKT, Molecular Innovations, Novi, MI). El dato se procesó usando Excel, JMP, y el software Prism Graph pad. En todos los casos, un valor de  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. En los puntos de tiempo de 6 horas y Día 7, se encontraron menores niveles de PAI-1 activo en el fluido IP y en lisados de cuerno uterino en los animales tratados con A44V11 frente al control de isotipo. (Véase la Figura 36). Los menores niveles de PAI-1 activo en el IPF a las 6 horas fue un resultado estadísticamente significativo mostrado en el fluido IP en el punto de tiempo de 6 horas en animales tratados con A44 frente al control de isotipo ( $p < 0,001$  por la prueba de la t de Student).

### Ejemplo 22: Estructura cristalina del anticuerpo humanizado A44V11

#### Expresión y purificación de Fab A44V11

Fab recombinante (rFab) se obtuvo a partir de células HEK293 transfectadas transitoriamente, usando dos plásmidos que codifican la cadena ligera o la cadena pesada etiquetada con His C-terminal. Tras la centrifugación y el filtrado, rFab procedente del sobrenadante celular se aplicó a una resina de afinidad de iones metálicos inmovilizados. Tras la elución de la resina, el rFab se dializó ampliamente contra PBS, y se almacenó a 4°C.

Fuente de PAI-1 de Macaca fascicularis, denominado como PAI-1 de macaco o cyno PAI-1:

PAI-1 de macaco maduro recombinante (24-402) se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli*, y la proteína recombinante se purificó usando métodos convencionales.

Fuente de PAI-1 humano:

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

Preparación y purificación de los complejos:

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

Cristalización del complejo de Fab A44V11 + Cyno PAI-1

El complejo se concentró hasta 10 mg/ml en 25 mM de MES, pH 6,5, 150 mM de NaCl. Cristaliza en etanol al 16-24%, 100 mM de Tris, pH 8,5. Como crioprotector, se usó etilenglicol (30%). Los cristales difractaron a alrededor de 3,3 Å en el grupo espacial P321 ( $a = b = 193$  Å,  $c = 144$  Å) en el equipo ID29 de ESRF. El dato se procesó con una combinación de XDS y Scala (GlobalPhasing Ltd., Cambridge, UK)

Determinación estructural del complejo Fab A44V11/Cyno-PAI-1:

Se construyó un modelo del dominio variable de Fab usando Prime in Maestro (Schrodinger, Nueva York, NY). El dominio constante se obtuvo a partir de la estructura publicada 3FO2. Se usaron dos modelos diferentes de PAI-1 humano: la conformación latente se obtuvo de 1LJ5, la conformación activa de 1OC0. El cálculo del Coeficiente de

Matthews ( $V_M$ , volumen del cristal por unidad de peso molecular de la proteína) sugiere que hay hasta cuatro complejos en la unidad asimétrica ( $V_M 2,2$ , suponiendo un tamaño complejo de 90 kilodaltons (KD). La sustitución molecular se realizó usando Phaser (CCP4 suite) (McCoy, et al. J. Appl. Cryst. 40: 658-674 (2007), que identificó dos monómeros de PAI-1 latente y dos dominios variables de Fab. La densidad adicional fue claramente visible para los dominios constantes, que se tuvieron que colocar manualmente. Esta solución, que corresponde a un  $V_M$  de 4,3 (71% de disolvente), también se examinó cuidadosamente para determinar la consistencia del empaquetamiento. La estructura se refinó con Buster (GlobalPhasing) usando simetría no cristalográfica, hasta un  $R_{libre}$  de 29,2% (Rfactor 25,8%). Los dominios constantes no se estabilizaron mediante empaquetamiento cristalino, y se resolvieron pobremente en el mapa de densidad electrónica.

#### 10 Cristalización del complejo Fab A44V11 + PAI-1 humano

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

Inicialmente, para determinar la estructura del complejo de PAI-1/Fab mAb, se usó un mAb A44 nativo para preparar su fragmento Fab mediante digestión con papaína. Esta preparación aumentada de escala de Fab dio como resultado fragmentos Fab heterogéneos que se complejaron y purificaron en complejo con la proteína PAI-1 de tipo salvaje (wt) humana. El complejo proteico obtenido se concentró hasta una concentración de 7 mg/ml, y se cribó para la cristalización en 800 condiciones de cristalización individuales a dos temperaturas diferentes, 4°C y 19°C. No se detectaron resultados de cristalización. A fin de mejorar la homogeneidad del complejo proteico, se produjo Fab A44 etiquetado con 6-His recombinante, se purificó y se complejó con la proteína PAI-1 de tipo salvaje humana (véase la Figura 36).

El cribado de la cristalización del complejo dio como resultado los primeros éxitos de cristalización en condiciones de 20% de PEG10K + 0,1M de acetato de sodio pH 4,6. La optimización de la cristalización mediante métodos de cristalización convencionales, Sembrado en Matriz de Microsemillas, y cristalización de tripsinólisis *in situ*, no mejoró significativamente la calidad de los cristales. Los cristales mejor obtenidos fueron similares a agujas, y difrataron los rayos X con resolución insuficiente para la determinación de la estructura (10 Å).

El fracaso con la cristalización de los cristales del complejo se podría explicar potencialmente por la heterogeneidad conformacional del complejo. Se sabe que la molécula de PAI-1 de tipo salvaje adopta tres conformaciones diferentes (activa, latente y sustrato), que pueden interferir con la cristalización. Para mejorar la calidad de los cristales, se produjo Fab de A44 etiquetado con 6-His en complejo con PAI-1 latente. (Véase la Figura 37).

El complejo correspondiente se produjo y se cribó para la cristalización de novo y en las condiciones usadas previamente para el complejo de Fab A44 etiquetado con 6-His/ proteína PAI-1 wt. El único resultado de cristalización de las más de 1000 condiciones estudiadas se identificó para el complejo en las condiciones de 20% de PEG3350 + 0,2M de acetato de  $NH_4$  + 4% de MPD + 50 mM de MES pH 6 (véase la Figura 39 (a)). Tras la optimización exhaustiva, se obtuvieron cristales 3D. Los ensayos de difracción de rayos X usando un haz de rayos X de alta intensidad sincrotrónico no mostraron signos de difracción (véase la Figura 39(b), que representa cristales optimizados representativos).

Para reducir la flexibilidad de porciones de la proteína, se decidió producir un fragmento Fab de A44 recombinantemente pero sin una etiqueta artificial, tal como la etiqueta 6-His, usada previamente. Para incrementar además las oportunidades para una cristalización con éxito, se adquirió un mutante de forma activa de PAI-1 (N150H, K154T, Q319L, M354I) de Molecular Innovations (nº de Cat. CPAI, Novi, MI), y se usó para la preparación del complejo con la proteína Fab A44 que carece de etiqueta artificial. El complejo se concentró hasta 12 mg/ml en 25 mM de MES, pH 6,5, 150 mM de NaCl. Se obtuvieron cristales individuales aceptables similares a varillas en 10% de PEG3350, 100 mM de sulfato de amonio, y se crioprotegieron mediante la adición de 30% de etilenglicol (véase la Figura 40). Estos cristales difrataron a una resolución de 3,7 Å, y tras la optimización por crioprotección exhaustiva, dieron como resultado un conjunto de datos de difracción de rayos X adecuado para la determinación estructural (3,3 Å). Se recogió un conjunto de datos a 3,3 Å en un aparato Proxima 1 de sincrotrón SOLEIL (Saint-Aubin, Francia). El grupo espacial es P212121 ( $a = 105$ ,  $b = 152$ ,  $c = 298$ ). El dato se procesó usando la secuencia de comandos XDSme (XDS ref, Xdsme ref).

#### Determinación estructural del complejo Fab A44V11/PAI-1 humano:

Pointless (CCP4) indicó solamente una confianza de 40% en la identificación del grupo espacial. En consecuencia, se llevó a cabo una Sustitución Molecular inicial con Amore (CCP4), para estudiar todas las posibles variantes de grupos espaciales del grupo puntual P222: P212121 se confirmó sin ambigüedad. La Sustitución Molecular final con Phaser (Phaser, CCP4) identificó cuatro dímeros de PAI-1 activo/dominio variable de Fab, en la unidad asimétrica. Los dominios constantes se añadieron manualmente en el mapa de densidad electrónica. La estructura se refinó con Buster (GlobalPhasing) usando una simetría no cristalográfica, hasta un  $R_{libre}$  de 28% (Rfactor 24,1%).

## Análisis estructural del epítipo y del paratopo

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

PAI-1 interacciona mayoritariamente con la cadena pesada de A44V11, como se puede observar a partir del análisis de las áreas superficiales de interacción. El área superficial de la interacción entre PAI-1 humano activo y la cadena pesada (media de 4 complejos) es 674 Å<sup>2</sup>. El área superficial de la interacción entre PAI-1 humano activo y la cadena ligera (media de 4 complejos) es 372 Å<sup>2</sup>. El área superficial de la interacción entre PAI-1 latente de macaco y la cadena pesada (media de 2 complejos) es 703 Å<sup>2</sup>. El área superficial de la interacción entre PAI-1 latente de macaco y la cadena ligera (media de 2 complejos) es 360 Å<sup>2</sup>. Véanse las Figuras 43 y 44 para representaciones de los paratopos de la cadena pesada y cadena ligera, respectivamente.

Los restos de la parte de A44V11 del paratopo se muestran a continuación en la Tabla 36. Los restos en cursiva están implicados en las interacciones con PAI-1 activo, pero no con la forma latente, mientras que los restos subrayados interaccionan solamente con la forma latente. Todos los otros restos están implicados en ambas interfaces.

Tabla 36: Restos de A44V11 implicados en el paratopo con PAI-1

Localización	Restos
<b>Cadena pesada (Figura 43)</b>	
Bucle H1	<i>Thr30</i> , Asn31, Gly32, Tyr33 y Asn35
Bucle H2 y hebras β vecinas	Tyr47, Tyr50, Thr52, Tyr53, Ser54, <u>Gly55</u> , <i>Ser56</i> , <i>Thr57</i> y <i>Tyr58</i>
Bucle H3	Trp98, Tyr100 y Tyr104
<b>Cadena ligera (Figura 44)</b>	
Bucle L1:	Asn30 y Tyr32
Bucle L2:	Arg50 y Arg53
Bucle L3:	Tyr91, Asp92, <u>Glu93</u> , Phe94 y Pro96

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

VHHPSPSYVAHLASDFGVRVFQQAQASKDRNVVFSPPYGVASVLAMLQLTTG  
 GETQQQIQAAAMGFKIDDKGMALRHLKYELMGPNWKDEISTTDAIFVQRD  
 LKLVQGFMPHFRLFRSTVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISHLGLT  
 GAVDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRLFKSDGSTVSPMMAQT  
 NKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLMSFIAAPYEKEVPLSALTNILSAQLI  
 SHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSL  
**DQEPLHVALALQKVIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIIDRPFLFVVRH**  
 NPTGTVLFMGQVMEP

La taquigrafía para el epítipo de unión de A44V11 para PAI-1 humano es como sigue:

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

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

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

En resumen, los epítomos de macaco y humano de PAI-1 que reconocen FabA44 son idénticos en ambas conformaciones. Fab A44 reconoce tanto a PAI-1 humano como de macaco, pero probablemente no a PAI-1 de ratón o de rata.

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

- 5 Para determinar la especificidad y reactividad de A44V11, se usó la secuencia del epítipo de A44V11 (véase anteriormente) para buscar epítomos similares en otras proteínas usando una búsqueda de motivo con la base de datos de ScanProsite (SIB Swiss Institute of Bioinformatics). Para detalles adicionales, véase Artimo, P. et al. Nucleic Acids Res. 40(W1):W597-603 (2012). Todas las coincidencias de la secuencia epitópica localizadas en la búsqueda estaban relacionadas con PAI-1, sugiriendo que el anticuerpo A44V11 es específico para PAI-1.
- 10 El epítipo de A44V11 también se comparó con otras estructuras de rayos X conocidas (búsqueda 3D) usando un perfilado y modelado molecular *in silico* según Med-SuMo, que detecta y compara las funciones bioquímicas sobre las superficies de las proteínas, incluyendo, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, cargas, grupos hidrófobos y aromáticos. El modelado molecular Med-SuMo se describe adicionalmente en Jambon, et al. Bioinformatics 21(20):3929-30 (2005). La búsqueda 3D del epítipo de A44V11 localizó un motivo similar en alfa-1-antitripsina humana (AAT1). Sin embargo, con una investigación posterior, se encontró que el motivo de AAT1 tiene diferencias significativas entre el epítipo de A44V11, de manera que es improbable que se una A44V11. Por lo tanto, el análisis del patrón de secuencia y del patrón 3D del epítipo de A44V11 sugiere que debería de haber una reactividad cruzada mínima con otras proteínas humanas.
- 15

Los epítomos de PAI-1 humano y de macaco para A44V11 se compararon con epítomos propuestos de PAI-1 de ratón y de rata. Las secuencias se extraen de SEQ ID NO: 1 (PAI-1 humano), SEQ ID NO: 162 (PAI-1 de macaco), SEQ ID NO: 163 (PAI-1 de ratón) y SEQ ID NO: 164 (PAI-1 de rata). PAI-1 de rata y de ratón tienen respectivamente 75% y 79% de identidad de secuencia con PAI-1 humano. La alineación de las diferentes secuencias de PAI-1 muestra diferencias significativas entre la secuencia de rata/ratón y la humana/macaco en sus epítomos respectivos, sugiriendo que es improbable que A44V11 reconozca PAI-1 de rata o de ratón (véase la Figura 45). Por ejemplo, los aminoácidos Ser300, Thr302, Gln314 de PAI-1 de ratón son diferentes de las contrapartes de PAI-1 humano/de macaco. Las diferencias en estos restos representan un cambio en los epítomos propuestos, de manera que PAI-1 de ratón no puede ser reconocido por A44V11. La comparación estructural del PAI-1 de ratón con la estructura del complejo PAI-1 humano/A44V11 (Figura 46) indica además que no sería posible obtener actividad tanto humana como de ratón a partir del anticuerpo A44V11.

Para validar adicionalmente el epítipo identificado para A44V11, los epítomos de A44V11 de humano y de macaco se compararon con regiones de unión de vibronectina. Se ha publicado la estructura de PAI1 humano en complejo con el dominio de somatomedina B de vibronectina (1OC0). Se compararon las estructuras de estos dos complejos (véase la Figura 47). La comparación estructural sugiere que la unión de A44V11 no impactará la interacción de PAI-1 con vibronectina.

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

Finalmente, la especificidad y la falta de reactividad cruzada del anticuerpo A44V11 se confirmó mediante Biacore. En base a la secuencia única predicha y a la estructura 3D del epítipo de A44V11, los estudios de modelado molecular indican fuertemente que el A44V11 es específico para PAI-1 humano y de macaco.

### Ejemplo 24: Cartografiado epitópico mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX MS)

El intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX) monitorizado mediante espectrometría de masas (MS) se aplicó a los anticuerpos que se unen a PAI-1 descritos aquí, para caracterizar adicionalmente los epítomos de cada anticuerpo. HDX MS es una técnica particularmente útil para comparar múltiples estados de la misma proteína. En Wei, et al., Drug Discovery Today, 19(1): 95-102 (2014), se describen metodología y aplicaciones detalladas de HDX MS a sustancias terapéuticas proteicas. De forma breve, si en una disolución acuosa, todo el disolvente de H<sub>2</sub>O se sustituye por un isótopo de hidrógeno que tiene propiedades espectroscópicas distintivas, entonces se puede seguir este proceso de cambio. Para los experimentos de HDX más modernos, se usa agua deuterada o "pesada" (D<sub>2</sub>O). En particular, el hidrógeno enlazado al nitrógeno de la cadena principal (también denominado como el hidrógeno de amida de la cadena principal) es útil para sondear la conformación de la proteína. Véase, por ejemplo, Marcsisin, et al. Las regiones expuestas y dinámicas de las proteínas se intercambiarán rápidamente, mientras que las regiones protegidas y rígidas de las proteínas se intercambiarán de forma más lenta. Todas las condiciones relevantes (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.) se mantienen constantes, de manera que solamente la diferencia en la estructura (accesibilidad del disolvente, enlazamiento de hidrógeno) impacta a este intercambio. La interacción del anticuerpo con PAI-1 bloqueará el marcaje de ciertas porciones del antígeno, produciendo así una lectura diferente en base al sitio de unión (epítipo).

Método experimental:

Las disoluciones madre de cyno-PAI-1 (10  $\mu$ M), cyno-PAI-1 enlazado a A44v11 (10  $\mu$ M cada uno) y cyno-PAI-1 enlazado a APGv2 (10  $\mu$ M cada uno) se prepararon en PBS, pH 7,2. Las disoluciones de proteína se dejaron alcanzar el equilibrio de unión incubándolas durante 1 hora a temperatura ambiente. En base a un valor de  $K_d$  de <50 pM, cada uno de los complejos de anticuerpo:antígeno se unieron >99% en las condiciones de marcaje descritas más abajo.

El intercambio de deuterio, la desactivación, y la inyección de la muestra se manipularon mediante un sistema robótico automatizado (LEAP Tech., Carrboro, NC). Una alícuota de la disolución de proteína se diluyó 10 veces con amortiguador de marcaje (PBS en 99,9% de  $D_2O$ , pD 7,2), y se dejó incubar a 20°C durante 10 s, 1 min, 5 min, o 4 horas. Al final del punto de tiempo del intercambio de deuterio, la reacción de marcaje se detuvo añadiendo 50  $\mu$ l de la disolución de marcaje a un volumen igual de 100 mM de fosfato de sodio, 4 M de hidrocloreto de guanidina, 0,5 M de TCEP, pH 2,5, enfriado previamente (0°C). Los controles no deuterados se prepararon de manera idéntica diluyendo 10 veces con PBS en  $H_2O$ .

Cada muestra desactivada (50  $\mu$ l, 50 pmoles de cada proteína) se inyectó inmediatamente en un Waters nanoAcquity con HDX Technology (Waters Corp., Milford, MA). Las proteínas se digirieron en línea con una columna de pepsina de 2,1 mm x 30 mm Enzymate BEH (Waters Corp.), que se mantuvo a 20°C. Todos los elementos cromatográficos se mantuvieron a  $0,0 \pm 0,1^\circ C$  dentro de la cámara de enfriamiento del sistema de cromatografía de líquidos de ultraprestaciones (UPLC). Los péptidos resultantes se atraparon y se desalaron durante 3 min a 100  $\mu$ l/min, y después se separaron en una columna de 1,0 x 100,0 mm ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters Corp.) con un gradiente durante 12 min de 2-40% de acetonitrilo:agua a 40  $\mu$ l/min. Los niveles de deuterio no se corrigieron para el retrointercambio, y se dieron a conocer como relativos. Todos los experimentos de comparación se realizaron en condiciones idénticas, negando la necesidad de la corrección de retrointercambio. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. El sobrante peptídico entre inyecciones se eliminó inyectando 50  $\mu$ l de 1,5 M de hidrocloreto de guanidina, 0,8% de ácido fórmico, y 4% de acetonitrilo en todas las columnas después de cada experimento.

Los espectros de masas se adquirieron con un instrumento Waters Synapt G2-Si equipado con una fuente de electropulverización estándar (Waters Corp.) que se ejecuta en el modo HDMSe. Los ajustes del instrumento fueron los siguientes: el capilar fue 3,5 kV, el cono de muestreo fue 30 V, la compensación de la fuente fue 30 V, la temperatura de la fuente fue 80°C, la temperatura de desolvatación fue 175°C, el gas del cono fue 50 l/h, el gas de desolvatación fue 600 l/h, y el gas nebulizador fue 6,5 bares. Los espectros de masas se adquirieron a lo largo de un intervalo m/z de 50-1700. La exactitud de las masas se mantuvo a lo largo de cada experimento mediante infusión simultánea de 100 fmoles/ $\mu$ l de [Glu1]-fibrinopéptido B humano a lo largo de la sonda de calibración interna.

La identificación MSE de los péptidos pépticos no deuterados se llevó a cabo usando el software ProteinLynx Global Server (Waters Corp.). La captación de deuterio por cada péptido se determinó usando el software DynamX 2.0 (Waters Corp.). Los niveles relativos de deuterio se calcularon restando el centroide de la distribución isotópica para péptidos no deuterados del centroide correspondiente del péptido marcado con deuterio. Las gráficas de captación de deuterio se generaron automáticamente mediante el software.

#### Monitorización de la captación de deuterio para los estados de PAI-1

Tras la digestión en línea con pepsina, se identificaron 150 péptidos pépticos de PAI-1 de macaco que solapan, que dan como resultado una cobertura de secuencia de 95,3% (véase la Figura 48). La captación de deuterio se monitorizó (desde 10 s hasta 4 horas) en los 150 péptidos para los tres estados diferentes de la proteína: (1) PAI-1 de macaco solo; (2) A44v11 unido a PAI-1 de macaco; y (3) APGv2 unido a PAI-1 de macaco.

La mayoría de los péptidos de PAI-1 de macaco mostraron una captación de deuterio casi idéntica entre los tres estados, lo que indica que no hay ninguna interacción entre PAI-1 de macaco y cualquiera de los mAb en estas regiones. Véase la Figura 49(A), que representa una región peptídica representativa con este resultado (restos 139-152). Por el contrario, los péptidos que incorporan los restos 44-64 mostraron una protección significativa frente al intercambio (captación reducida de deuterio) cuando se unen a A44v11 o a APGv2 (Figura 49(B)). Además, los péptidos que incorporan los restos 295-322 también mostraron una protección significativa frente al intercambio cuando se unieron a A44v11 o a APGv2 (Figura 49(C)). Para esta región, la magnitud de la protección fue mayor cuando PAI-1 de macaco se unió a A44v11 en lugar de a APGv2 (véase la Figura 49(C)). Esto indica que A44v11 puede proporcionar una mayor protección global frente al intercambio que APGv2 cuando se une a PAI-1 de macaco.

#### Estudios de comparación:

Para los estudios de comparación, se monitorizó la captación de deuterio para los 150 péptidos generados a partir de cada uno de los tres estados de PAI-1 de macaco. (Véase, generalmente, Wei, et al., Drug Discovery Today, 19(1): 95-102 (2014)). Las gráficas de datos procedentes de cada uno de los tres estados se compararon entre sí, y se generó una gráfica de mariposa para facilitar la interpretación de los datos (véanse, por ejemplo, las Figuras 50(A), 51(A) y 52(A)). Para cada gráfica de mariposa, el eje x es la posición de punto medio de los péptidos

calculada,  $i$ , de cada uno de los 150 péptidos comparados; el eje  $y$  es el intercambio fraccional relativo medio (relación).

También se generaron gráficas de diferencias para cada comparación entre los estados de PAI-1 de macaco (véanse, por ejemplo, las Figuras 50(B), 51(B) y 52(B)). En estas gráficas, la captación de deuterio de un estado se resta del otro y se representa gráficamente de forma similar a las gráficas de mariposa. La suma de las diferencias para cada péptido se representa mediante una barra vertical. Las líneas discontinuas horizontales representan los valores a los cuales las medidas individuales ( $\pm 0,5$  Da) o la suma de las diferencias ( $\pm 1,1$  Da) exceden el error de la medida y se pueden considerar como diferencias reales entre los dos estados. Los detalles adicionales con respecto a esta técnica se describen en Houde D. et al., J. Pharm. Sci. 100(6):2071-86 (2011).

En primer lugar, PAI-1 de macaco solo se comparó con el estado unido de A44v11:cyno-PAI-1 (Figura 50). La gráfica de mariposa para esta comparación se muestra en la Figura 50(A). La gráfica de diferencias para esta comparación se muestra en la Figura 50(B). Las diferencias observadas entre PAI-1 de macaco unido a A44v11 y PAI-1 de macaco en forma libre están localizadas principalmente en dos regiones de PAI-1 de macaco. Una región está próxima al término N (restos 44-64), y la otra región está próxima al término C (restos 307-321) (véase la Figura 50(B)).

A continuación, PAI-1 de macaco solo se comparó con el estado unido de APGv2:cyno-PAI-1 (Figura 51). La gráfica de mariposa para esta comparación se muestra en la Figura 51(A). La gráfica de diferencias para esta comparación se muestra en la Figura 51(B). Las diferencias observadas entre PAI-1 de macaco unido a APGv2 y PAI-1 de macaco en forma libre están localizadas principalmente en dos regiones de PAI-1 de macaco. Una región está próxima al término N, y la otra está próxima al término C, que es similar al resultado de A44v11:cyno-PAI-1. Los complejos de A44v11 y APGv2 con PAI-1 de macaco comparten péptidos que muestran una captación reducida de deuterio cuando están en el estado unido, lo que puede indicar que los epítomos para los dos anticuerpos son similares.

Finalmente, los dos estados de PAI-1 de macaco unido a los anticuerpos se compararon entre sí (Figura 52). La gráfica de mariposa para esta comparación se muestra en la Figura 52(A). La gráfica de diferencias para esta comparación se muestra en la Figura 52(B). La diferencia observada entre A44v11:cyno-PAI-1 y APGv2:cyno-PAI-1 está situada en la región C-terminal de PAI-1 de macaco. (Véase la Figura 52(B)).

#### **Ejemplo 25: Comparación de epítomos de los anticuerpos A44v11 y APGv2**

Para definir adicionalmente los epítomos de los anticuerpos A44v11 y APGv2, se usó HDX MS. Usando los péptidos que solapan generados en HDX MS, un epítomo de anticuerpo se pudo refinar hasta una resolución ligeramente mejor que el nivel peptídico (por ejemplo, véase la Figura 48). El dato de HDX MS para los péptidos que mostraron protección significativa frente al intercambio con la unión a A44V11 se analizó adicionalmente para determinar el epítomo para la interacción cyno-PAI-1:A44v11. Se encontró que el dato de HDX para el epítomo de A44V11 de PAI-1 de macaco es consistente con el epítomo determinado usando el enfoque de cristalografía. El epítomo de A44V11 de PAI-1 de macaco identificado usando HDX MS aparece en la Figura 53 (negrita), y a continuación en formato taquigráfico:

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

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

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

El dato de HDX MS para los péptidos de PAI-1 de macaco que mostraron protección significativa frente al intercambio con la unión a APGv2 se analizó para determinar adicionalmente el epítomo para la interacción cyno-PAI-1:APGv2. El dato de cartografiado epitópico de HDX MS para A44v11 y APGv2 muestra que los epítomos están en la misma región, como se observa generalmente en la Figura 52. En la región de los restos 307-321, los mismos péptidos muestran protección en el estado unido al anticuerpo, tanto para A44v11 como para APGv2. Sin embargo, la magnitud de protección es mayor cuando PAI-1 de macaco está unido a A44v11 en vez de a APGv2 (véase la Figura 49(C)). Este hallazgo es más manifiesto en la Figura 52(B), que representa los picos de diferencias en la región de los restos 307-321 de PAI-1 de macaco. Esto indica que hay diferencias en los contactos específicos que se hacen entre PAI-1 de macaco y cada uno de los anticuerpos A44V11 y APGv2. Por lo tanto, parece que aunque los epítomos tanto de A44V11 y como de APGv2 están situados en una región similar de PAI-1, los epítomos para cada anticuerpo no son los mismos.

Listado de secuencias

<110> Sanofi

<120> ANTICUERPOS CONTRA EL INHIBIDOR DE LOS ACTIVADORES DEL PLASMINOGENO DE TIPO 1 (PAI-1) Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 13-596-WO

<160> 147

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 1

```

Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala His Leu Ala Ser Asp Phe Gly
1          5          10          15

Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val
          20          25          30

Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser Val Leu Ala Met Leu Gln Leu
          35          40          45

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Gln Gln Gln Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe
50          55          60

Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys
65          70          75          80

Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asp Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala
          85          90          95

Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu Val Gln Gly Phe Met Pro His
100          105          110

Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu
115          120          125

Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn Asp Trp Val Lys Thr His Thr
130          135          140

Lys Gly Met Ile Ser Asn Leu Leu Gly Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu
145          150          155          160

Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys
165          170          175

```

# ES 2 770 507 T3

Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His Arg Arg Leu Phe His Lys Ser  
 180 185 190  
 Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe  
 195 200 205  
 Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu  
 210 215 220  
 Glu Leu Pro Tyr His Gly Asp Thr Leu Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro  
 225 230 235 240  
 Tyr Glu Lys Glu Val Pro Leu Ser Ala Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala  
 245 250 255  
 Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu  
 260 265 270  
 Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys  
 275 280 285  
 Pro Leu Glu Asn Leu Gly Met Thr Asp Met Phe Arg Gln Phe Gln Ala  
 290 295 300  
 Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu Pro Leu His Val Ala Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser  
 325 330 335  
 Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile  
 340 345 350  
 Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Val Arg His Asn Pro Thr Gly  
 355 360 365  
 Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met Glu Pro  
 370 375

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA105 VH

<400> 2

# ES 2 770 507 T3

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Phe  
65 70 75 80

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

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

Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
115 120

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA105 VL

<400> 3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

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

Pro Gln Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Gly Ala Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp

# ES 2 770 507 T3

85

90

95

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

Arg Ala Asp  
115

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA39 VH

<400> 4

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

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

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

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

Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met  
65 70 75 80

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

Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
115 120 125

10 <210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> mA39 VL

<400> 5

# ES 2 770 507 T3

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Asn Ile Lys Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Phe Tyr Cys Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA44 VH

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

# ES 2 770 507 T3

100

105

110

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

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA44 VL

<400> 7

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr  
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

10 <210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> mA71 VH

<400> 8

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

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

# ES 2 770 507 T3

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
115 120

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA71 VL

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

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

Arg Ala Asp

115

10

<210> 10

<211> 140

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> mB109 VH

<400> 10

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Trp	Ile	Gly	50	55	60	
Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Glu	65	70	75	80
Asp	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	85	90	95	
Glu	Val	Ser	Ser	Leu	Thr	Asn	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	100	105	110	
Arg	Gly	Leu	Arg	Arg	Trp	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	115	120	125	
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	130	135	140					

<210> 11

<211> 110

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mB109 VL

<400> 11

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

15

# ES 2 770 507 T3

Asp Arg Val Ser Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala  
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp  
100 105 110

<210> 12

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mB28 VH

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro

10 115 120 125

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> mB28 VL

<400> 13

```

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

Ala Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
          35           40           45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Tyr Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp
          100          105          110

```

<210> 14

<211> 121

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mC45 VH

<400> 14

```

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

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

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

```

15

# ES 2 770 507 T3

Gly Val Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mC45 VL

<400> 15

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr  
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg  
85 90 95

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

10 <210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 770 507 T3

<223> mE16 VH

<400> 16

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

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

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

Ala Ser Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 17

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mE16 VL

10 <400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

# ES 2 770 507 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

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

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

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mE21 VH

<400> 18

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

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Asp Pro Lys Phe  
50 55 60

Gln Ala Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

10 <210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> mE21 VL

<400> 19

# ES 2 770 507 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA105 HCDR3

<400> 20

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr  
1 5 10

10 <210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> mA105 HCDR2

<400> 21

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr  
1 5

<210> 22

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA105 HCDR1  
 <400> 22  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Trp  
 1 5  
 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA105 LCDR3  
 <400> 23  
 Trp Gln Asp Arg His Phe Pro Arg Thr  
 1 5  
 <210> 24  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA105 LCDR2  
 <400> 24  
 Leu Val Ser  
 1  
 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA105 LCDR1  
 <400> 25  
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr  
 1 5 10  
 <210> 26

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> mA39 HCDR3  
 <400> 26  
 Ala Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 27  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA39 HCDR2  
 <400> 27  
 Ile Leu Pro Gly Ser Asn Thr  
 1 5  
 15 <210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> mA39 HCDR1  
 <400> 28  
 Gly Tyr Thr Phe Asn Ile Tyr Trp  
 1 5  
 <210> 29  
 25 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA39 LCDR3  
 30 <400> 29

		Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Thr
	1	5
	<210>	30
	<211>	3
	<212>	PRT
5	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	mA39 LCDR2
	<400>	30
	Asn Ala Lys	
	1	
10	<210>	31
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
15	<223>	mA38 LCDR1
	<400>	31
	Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr	
	1	5
	<210>	32
	<211>	13
20	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	mA44 HCDR3
	<400>	32
25	Ala Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
	1	5 10
	<210>	33
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
30	<220>	

<223> mA44 HCDR2  
 <400> 33  
 Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr  
 1 5  
 <210> 34  
 5 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA44 HCDR1  
 10 <400> 34  
 Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr  
 1 5  
 <210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA44 LCDR3  
 <400> 35  
 Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro Thr  
 1 5  
 20 <210> 36  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> mA44 LCDR2  
 <400> 36  
 Arg Ala Asn  
 1  
 <210> 37  
 <211> 6  
 30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA44 LCDR1  
 <400> 37  
 Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
 1 5  
 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA71 HCDR3  
 <400> 38  
 Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asn Leu Asp Ser  
 1 5 10  
 <210> 39  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA71 HCDR2  
 <400> 39  
 Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr  
 1 5  
 <210> 40  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA71 HCDR1  
 <400> 40  
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp  
 1 5  
 <210> 41

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> mA71 LCDR3  
 <400> 41  
 Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Arg Thr  
 1 5  
 <210> 42  
 <211> 3  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA71 LCDR2  
 <400> 42  
 Leu Val Ser  
 15 1  
 <210> 43  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> mA71 LCDR1  
 <400> 43  
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr  
 1 5 10  
 <210> 44  
 25 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA75 HCDR3  
 30 <400> 44

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 45

$\langle 211 \rangle$  8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> mA75 HCDR2

<400> 45

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr  
1 5

10                      <210> 46

<211> 8

&lt;212&gt; PRT

### <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

15 <223> mA75 HCDR1

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp  
1 5

<210> 47

<211> 9

20 <212> PRT

### <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> mA75 LCDR3

<400> 47

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Gln Thr  
1 5

<210> 48

$\langle 211 \rangle$  3

<212> PRT

### <213> Secuencia artificial

30                      <220>

<223> mA75 LCDR2  
 <400> 48  
 Leu Val Cys  
 1  
 <210> 49  
 5 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mA75 LCDR1  
 10 <400> 49  
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Gly Lys Thr Tyr  
 1 5 10  
 <210> 50  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mB109 HCDR3  
 <400> 50  
 Thr Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10  
 20 <210> 51  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> mB109 HCDR2  
 <400> 51  
 Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr  
 1 5  
 <210> 52  
 <211> 8  
 30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mB109 HCDR1  
 <400> 52  
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp  
 1 5  
 <210> 53  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mB109 LCDR3  
 <400> 53  
 Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 54  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mB109 LCDR2  
 <400> 54  
 Ser Ala Ser  
 1  
 <210> 55  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mB109 LCDR1  
 <400> 55  
 Gln Asp Val Ser Ser Ala  
 1 5  
 <210> 56

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> mB28 HCDR3  
 <400> 56  
 Ala Arg Leu Ser Thr Gly Thr Arg Gly Ala Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 57  
 <211> 8  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mB28 HCDR2  
 <400> 57  
 Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Ala  
 1 5  
 15 <210> 58  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> mB28 HCDR1  
 <400> 58  
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Ser Trp  
 1 5  
 <210> 59  
 25 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mB28 LCDR3  
 30 <400> 59

	Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr
	1 5
	<210> 60
	<211> 3
	<212> PRT
5	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> mB28 LCDR2
	<400> 60
	Asn Ala Lys
	1
10	<210> 61
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
15	<223> mB28 LCDR1
	<400> 61
	Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
	1 5
	<210> 62
	<211> 14
20	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> mC45 HCDR3
	<400> 62
25	Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr
	1 5 10
	<210> 63
	<211> 8
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
30	<220>

<223> mC45 HCDR2  
 <400> 63  
 Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr  
 1 5  
 <210> 64  
 5 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mC45 HCDR1  
 10 <400> 64  
 Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu  
 1 5  
 <210> 65  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mC45 LCDR3  
 <400> 65  
 Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Thr  
 1 5  
 20 <210> 66  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> mC45 LCDR2  
 <400> 66  
 Arg Ala Asn  
 1  
 <210> 67  
 <211> 6  
 30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mC45 LCDR1  
 <400> 67  
 Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
 1 5  
 <210> 68  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mE16 HCDR3  
 <400> 68  
 Ala Arg Gly Leu Arg His Trp Gly Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 69  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mE16 HCDR2  
 <400> 69  
 Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr  
 1 5  
 <210> 70  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mE16 HCDR1  
 <400> 70  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 1 5  
 <210> 71

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> mE16 LCDR3  
 <400> 71  
 Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 72  
 <211> 3  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mE16 LCDR2  
 <400> 72  
 Ser Ala Ser  
 15 1  
 <210> 73  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> mE16 LCDR1  
 <400> 73  
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 1 5  
 <210> 74  
 25 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> mE21 HCDR3  
 30 <400> 74

	Met	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
	1				5					10	
	<210> 75										
	<211> 8										
	<212> PRT										
5	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> mE21 HCDR2										
	<400> 75										
	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asp	Thr			
	1				5						
10	<210> 76										
	<211> 8										
	<212> PRT										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
15	<223> mE21 HCDR1										
	<400> 76										
	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr	Tyr			
	1				5						
	<210> 77										
	<211> 9										
20	<212> PRT										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> mE21 LCDR3										
	<400> 77										
25	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr		
	1				5						
	<210> 78										
	<211> 3										
	<212> PRT										
	<213> Secuencia artificial										
30	<220>										

<223> mE21 LCDR2

<400> 78

Tyr Thr Ser  
1

<210> 79

5 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mE21 LCDR1

10 <400> 79

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
1 5

<210> 80

<211> 124

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA75 VH

<400> 80

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

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

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

Ala Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe  
50 55 60

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
115 120

20

<210> 81

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> mA75 VL

<400> 81

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

Gln Pro Ala Ser Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu  
20 25 30

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

Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Cys Lys Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp  
50 55 60

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

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

His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Ala Asp

10

<210> 82

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> HC1a

<400> 82

# ES 2 770 507 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 83

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC1b

<400> 83

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

# ES 2 770 507 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC2a

<400> 84

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> HC2b

<400> 85

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 86

10

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC3

15

<400> 86

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

# ES 2 770 507 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 87

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC4

<400> 87

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 88

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> HC5a

<400> 88

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 89

10

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC5b

15

<400> 89

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

# ES 2 770 507 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 90

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC5a

<400> 90

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> LCla

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 92

10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC1b

15

<400> 92

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

Gln Thr Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

# ES 2 770 507 T3

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC2

<400> 93

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

10 <210> 94

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 770 507 T3

<223> LC3

<400> 94

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
          20           25           30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
          85           90           95

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

```

<210> 95

5

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC4

10

<400> 95

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
          20           25           30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
          85           90           95

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

```

<210> 96

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> LC5a

<400> 96

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 97

10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC5b

15

<400> 97

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

# ES 2 770 507 T3

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 98

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC5c

<400> 98

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

10 <210> 99

<211> 255

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 770 507 T3

<223> CH

<400> 99

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
245 250 255

5

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CL

<400> 100

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> vk1

<400> 101

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

# ES 2 770 507 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 102

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> vlamba3

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (22)..(22)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (87)..(87)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 102

# ES 2 770 507 T3

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

Thr Ala Ser Ile Thr Xaa Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

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

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Xaa Gln Ala Trp Asp Ser Ser Ala Val Val  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 103

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> vh2

<400> 103

# ES 2 770 507 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 104

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> vh4

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (22)..(22)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (95) .. (95)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 104

# ES 2 770 507 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Xaa Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Xaa Ala  
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada 3'- Cebador

<400> 105

tatgcaaggc ttacaaccac a 21

10 <210> 106

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cadena ligera 3'- Cebador

<400> 106

ctcattcctg ttgaagctct tgag 24

<210> 107

<211> 107

# ES 2 770 507 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IGKV1-33-01\_IGKJ4-01

5

<400> 107

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20           25           30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 108

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IGHV4-59-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02

<400> 108

```

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
          50           55           60

```

10

# ES 2 770 507 T3

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 109

<211> 226

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv1 LC1a x HC1a

<400> 109

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys  
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

# ES 2 770 507 T3

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 110

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv2 LC1b x HC1b

<400> 110

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

Gln Thr Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Ile Lys Glu Met Gln Leu Gln  
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr

# ES 2 770 507 T3

115

120

125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 111

<211> 226

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv3 LC2 x HC2a

<400> 111

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

# ES 2 770 507 T3

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys  
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 112

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv4 LC1a x HC2b

<400> 112

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

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

5

# ES 2 770 507 T3

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys  
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 113

<211> 226

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv5 LC2 x HC2b

<400> 113

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

# ES 2 770 507 T3

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys  
 100 105 110  
 Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
 115 120 125  
 Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
 130 135 140  
 Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
 165 170 175  
 Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
 180 185 190  
 Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
 195 200 205  
 Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 210 215 220  
 Ser Ser  
 225  
 <210> 114  
 <211> 226  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> A44-hv6 LC3 x HC3  
 <400> 114  
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

# ES 2 770 507 T3

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr	20	25	30
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile	35	40	45
Tyr Arg Ala Asn Arg Ser Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75
Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys	100	105	110
Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr	115	120	125
Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile	130	135	140
Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr	145	150	155
Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile	165	170	175
Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val	180	185	190
Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly	195	200	205
Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val	210	215	220

Ser Ser  
225

<210> 115

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv7 LC4 x HC4

# ES 2 770 507 T3

<400> 115

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys  
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser

225

<210> 116

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

# ES 2 770 507 T3

<220>

<223> A44-hv8 LC5a x HC5a

<400> 116

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln  
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Ser Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 117

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv9 LC5b x HC5b

<400> 117

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln  
100 105 110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 118

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv10 LC5c x HC5c

<400> 118

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln  
100 105 110

Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 119

<211> 226

<212> PRT

# ES 2 770 507 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv11 LC2 x HC3

<400> 119

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys  
100 105 110

5 Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
115 120 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 120

<211> 226

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A44-hv12 LC4 X HC3

5

&lt;400&gt; 120

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys  
 100 105 110

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
 115 120 125

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
 130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile  
 165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
 195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 210 215 220

Ser Ser  
 225

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv13 LC2 x HC5b

5

<400> 121

Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	20	25	30	
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Pro	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gln	Met	Gln	Leu	Gln	100	105	110	
Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	115	120	125	
Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Met	Thr	Asn	Gly	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	130	135	140	
Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Met	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	145	150	155	160
Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	165	170	175	
Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	180	185	190	
Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	His	Tyr	Gly	195	200	205	
Ser	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	210	215	220	
Ser	Ser															225			

<210> 122

<211> 226

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A44-hv14 LC4 x HC5b

5

<400> 122

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
          20           25           30

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

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln
          100          105          110

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
          115          120          125

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile
          130          135          140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr
145          150          155          160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile
          165          170          175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
          180          185          190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly
          195          200          205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
210          215          220

Ser Ser
225

```

<210> 123

	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> HC1a	
	<400> 123	
	gagatgaccc tgaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccaccagac cctgagcctg	60
	acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagtcc	120
	cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
	cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg	240
	accctgtcca gcgtg	255
	<210> 124	
10	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HC1b	
15	<400> 124	
	gagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg	60
	acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagtcc	120
	cccggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
	cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg	240
	aagctgtcca gcgtg	255
	<210> 125	
	<211> 255	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HC2a	
	<400> 125	

# ES 2 770 507 T3

	gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg	60
	acctgcagcg tgaccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc	120
	cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
	cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg	240
	accctgtcca gcgtg	255
	<210> 126	
	<211> 255	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HC2b	
	<400> 126	
	gagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg	60
	acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggaagttc	120
	cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
	cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg	240
10	accctgtcca gcgtg	255
	<210> 127	
	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> HC3	
	<400> 127	
	cagatgaccc tgaaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg	60
	acctgcagcg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagttc	120
	cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
	cccagcctga agggccggat caccatcacc cgggacacca gcaagaacca gtactacctg	240
	accctgagca gcgtg	255
	<210> 128	
20	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

# ES 2 770 507 T3

<223> HC4

<400> 128

cagatgaccc tgaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccacccagac cctgagcctg	60
acctgcagcg tgtccggcga gagcatgacc cagggctact ggaactggat ccggcagttc	120
cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agggccggat caccatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg	240
accctgagca gcgtg	255

<210> 129

5 <211> 255

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC5a

10 <400> 129

caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg	60
acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc	120
cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agtcccggat caccatcagc cggaacacca gcaagaacca gtacagcctg	240
aagctgagca gcgtg	255

<210> 130

<211> 255

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC5b

<400> 130

cagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg	60
acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc	120
cctggcaagg gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac	180
cccagcctga agtcccggat caccatcagc cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg	240
aagctgagca gcgtg	255

20 <210> 131

<211> 255

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC5c

5

<400> 131

cagatgcagc tgcagcagag cggccctggc ctggtcaaac ccagccagac cctgagcctg	60
acctgcgcca tcagcggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagagc	120
cccagcagag gcctcgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacgcc	180
gtgtccgtga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg	240
cagctgagca gcgtg	255

<210> 132

<211> 255

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC1a

<400> 132

gacatcaaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgacc	60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaacgcga gcgtggacgg cgtgccaagc	180
agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc	240
gaggacctgg gcatc	255

15

<210> 133

<211> 255

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> LC1b

<400> 133

gacatcaaga tgaccagag cccagcagc gtgtccgtgt ctctggcca gaccgtgacc	60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
ggccagtccc ccaagaccct gatctaccgg gccaacgcga gcgtggacgg cgtgccaagc	180
agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcaggcc	240
atggacgagg gcatc	255

	<210> 134	
	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> LC2	
	<400> 134	
	gacatcaaga tgacccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
	ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccagcgga gcgtggaagg cgtgccaagc	180
	agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc	240
	gaggacctgg gcatc	255
	<210> 135	
10	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LC3	
15	<400> 135	
	gacatcaaga tgacccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
	ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaacgca gcgtggacgg cgtgccaagc	180
	agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc	240
	gaggacctgg ccacc	255
	<210> 136	
	<211> 255	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LC4	
	<400> 136	

# ES 2 770 507 T3

	gacatcaaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
	ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccagcgga gcgtggaagg cgtgccaagc	180
	agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc	240
	gaggacctgg ccacc	255
	<210> 137	
	<211> 255	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LC5a	
	<400> 137	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctaccgg gccaacgca gcgtggacgg cgtgccaagc	180
	agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc	240
	gaggatatcg ccacc	255
10	<210> 138	
	<211> 255	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> LC5b	
	<400> 138	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagaccct gatctaccgg gccaacgca gcgtggacgg cgtgccaagc	180
	agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacaccttca ccatcagcag cctgcagccc	240
	gaggatatcg ccacc	255
	<210> 139	
	<211> 255	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> LC5c

<400> 139

```
gagatcgtga tgacctagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc      60
ctgagctgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc      120
ggccaggccc ccagaaccct gatctaccgg gccaacagaa gcgtggacgg catccccgcc      180
agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc      240
gaggacttcg ccgtg                                     255
```

<210> 140

5

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA44 VH

10

<400> 140

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly
      20              25              30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
      35              40              45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50              55              60

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100              105              110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
      115
```

<210> 141

<211> 107

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 770 507 T3

<223> mA44 VL

<400> 141

Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Ser	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr
65					70					75					80
Glu	Asp	Met	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Pro
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 142

5

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mA44 VL

10

<400> 142

Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Ser	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr
65					70					75					80
Glu	Asp	Met	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Pro
				85					90					95	

# ES 2 770 507 T3

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe  
115

<210> 143

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IGKV3-11-02\_IGKJ4-0

<400> 143

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

10 <210> 144

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> IGHV6-1-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02

<400> 144

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

# ES 2 770 507 T3

20

25

30

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

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

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

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

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

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

<210> 145

<211> 3

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 145

Arg Ala Gln  
1

10 <210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintética

<400> 146

Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr  
1 5

<210> 147

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 147

Gly	Asp	Ser	Met	Thr	Gln	Gly	Tyr
1				5			

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente al inhibidor de los activadores del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que comprende:

- 5 (a) regiones estructurales de cadena pesada y una región variable de cadena pesada, comprendiendo la región variable de cadena pesada una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 32, y una estructural de cadena ligera y una región variable de cadena ligera, comprendiendo la región variable de cadena ligera una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 145, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35; o
- 10 (b) una región estructural de cadena pesada y una región variable de cadena pesada, comprendiendo la región variable de cadena pesada una región CDR1 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 34, una región CDR2 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 33, y una región CDR3 de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 32, y una región estructural de cadena ligera y una región variable de cadena ligera, comprendiendo la región variable de cadena ligera una región CDR1 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37, una región CDR2 de
- 15 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 36, y una región CDR3 de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35; o
- (c) una región estructural de cadena pesada y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 86, y una región estructural de cadena ligera y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93; o
- 20 (d) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 82, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (e) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 83, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que
- 25 comprende SEQ ID NO: 92, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (f) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 84, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (g) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 85, o
- 30 fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 91, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (h) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 85, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- 35 (i) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 86, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 94, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (j) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 87, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende
- 40 SEQ ID NO: 95, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (k) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 88, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 96, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (l) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 89, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende
- 45 SEQ ID NO: 97, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (m) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 90, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 98, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- 50 (n) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 86, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 95, o fragmento de unión a antígeno de la misma; u

- (o) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 89, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 93, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- 5 (p) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 89, o fragmento de unión a antígeno de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 95, o fragmento de unión a antígeno de la misma; o
- (q) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 6, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 7
- 10 2. El anticuerpo contra PAI-1 de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de fibrosis, fibrosis cutánea, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar crónica, fibrosis hepática, fibrosis renal, enfermedad renal crónica, trombosis, trombosis venosa y arterial, trombosis de venas profundas, isquemia de miembros periféricos, trombosis de coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico agudo con y sin trombólisis, o restenosis de endoprótesis vascular.
- 15 3. El anticuerpo contra PAI-1 para el uso de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo contra PAI-1 se administra a un paciente por vía oral, parenteral mediante una disolución inyectable, por inhalación, o por vía tópica.

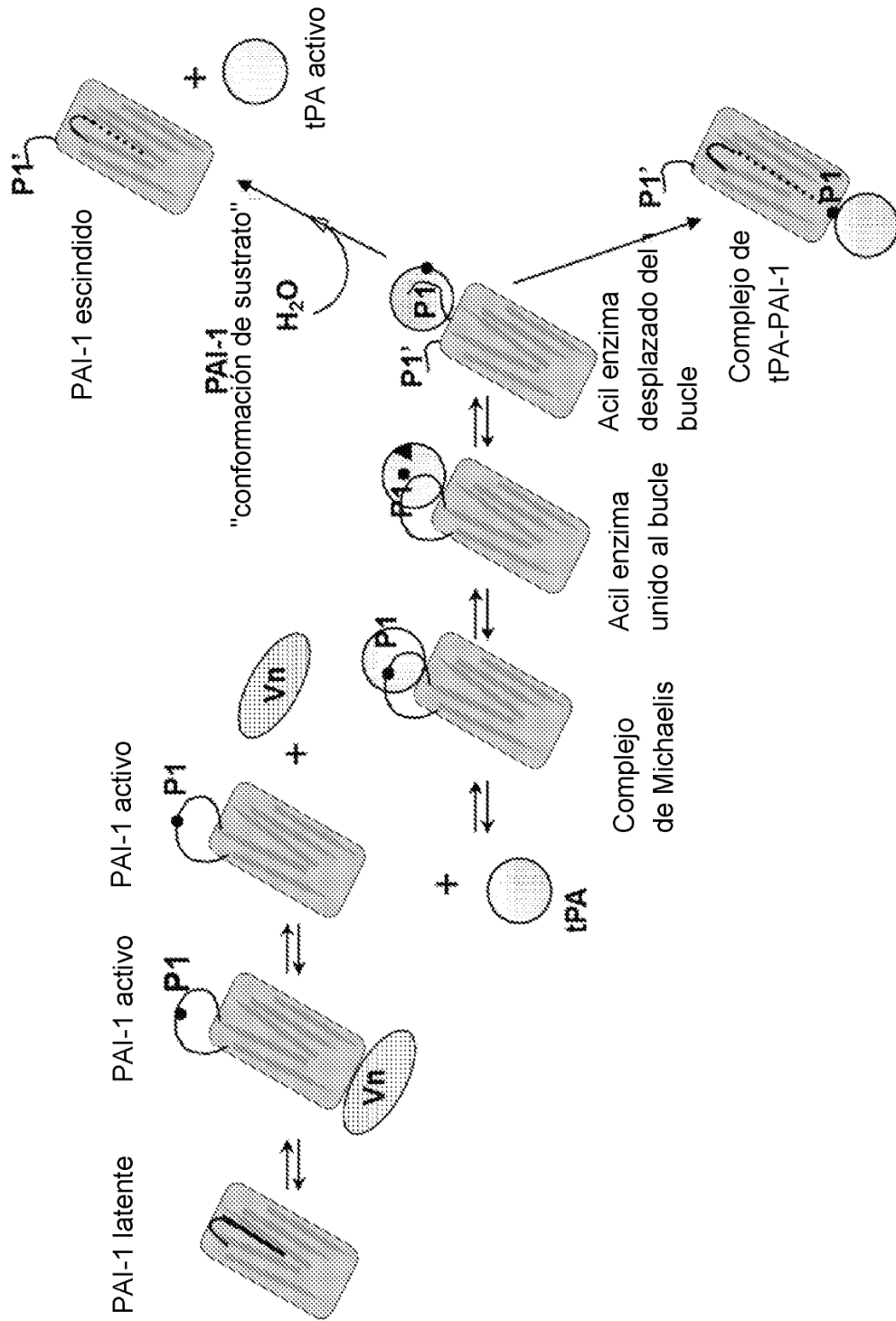


FIG. 1

Titulación de mAb en el complejo de Vn/PAI-1 (ELISA)

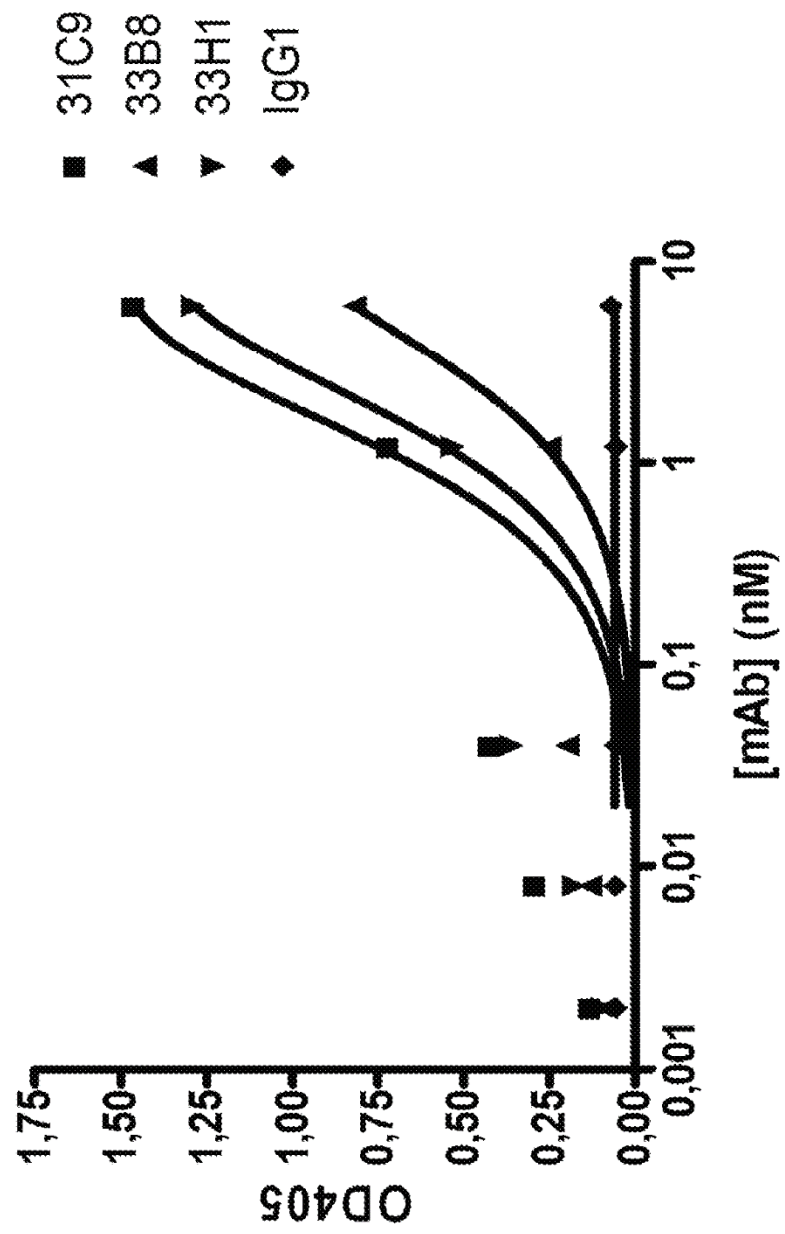


FIG. 2

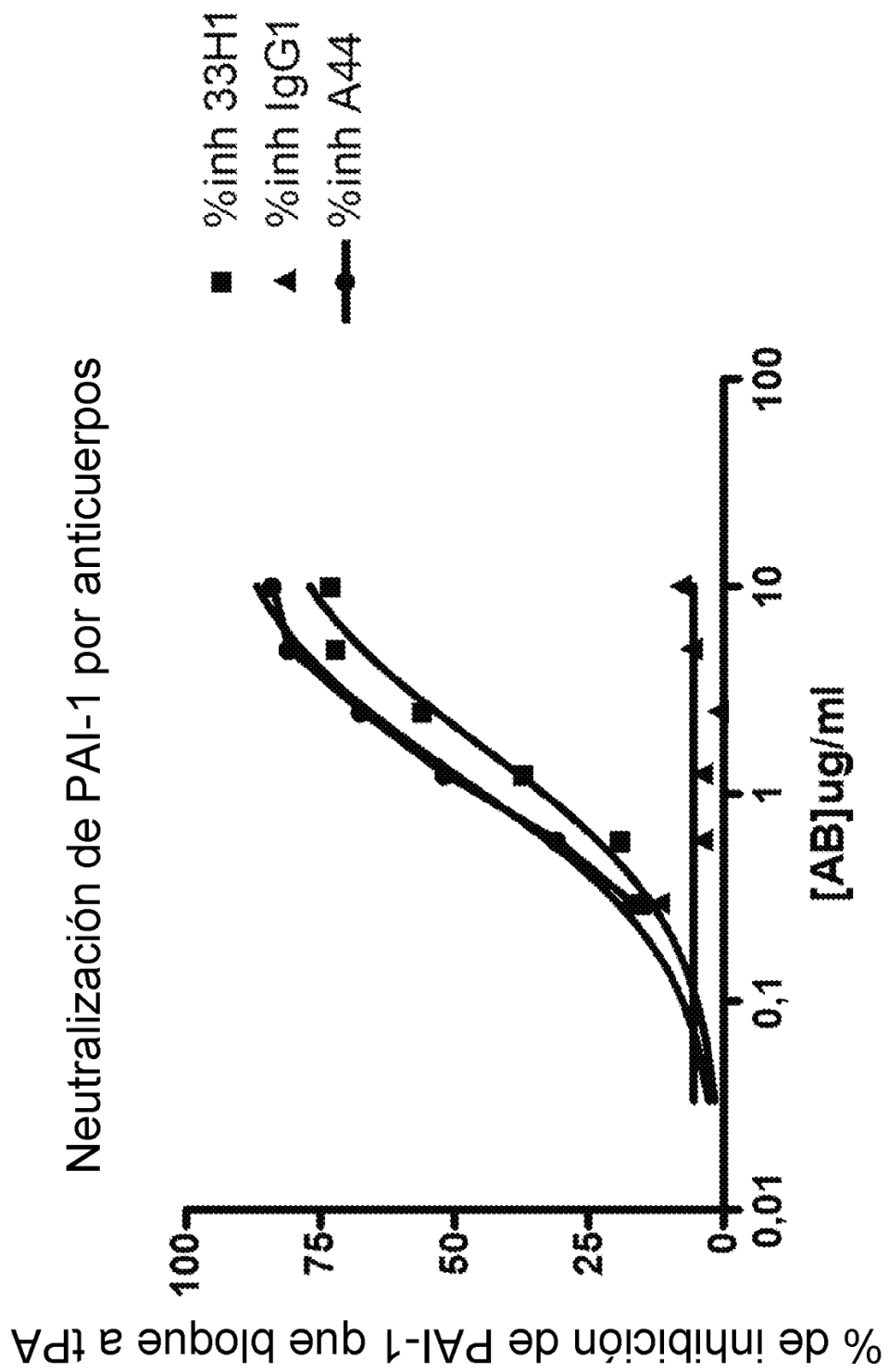
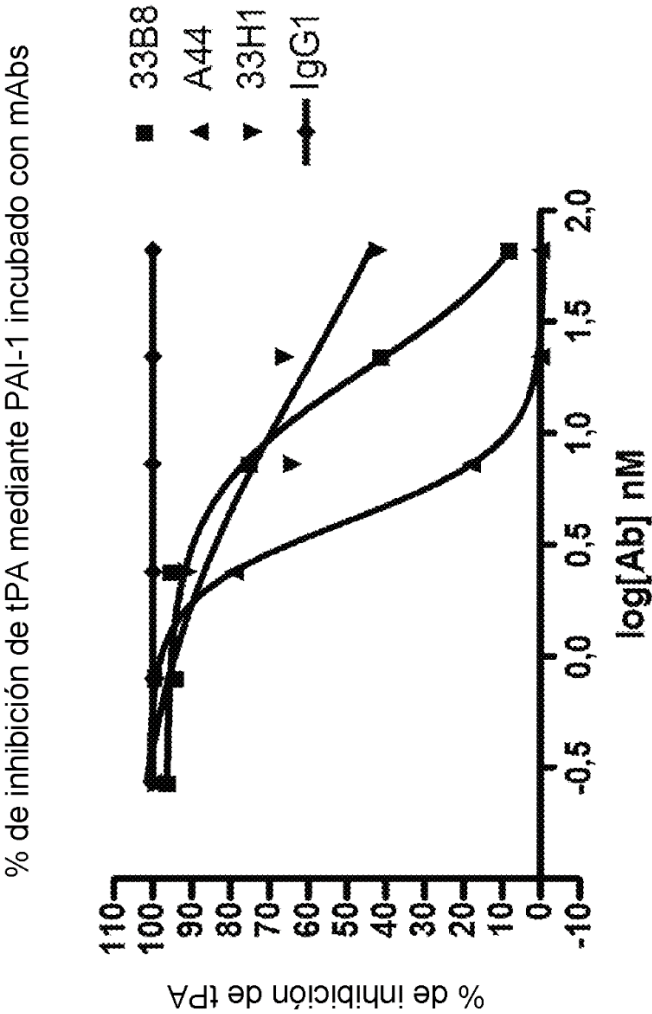


FIG. 3



Respuesta a la dosis sigmoideal (pendiente variable)		33B8	A44	33H1
Valores de mejor ajuste				
INFERIOR		-7,036	-0,6570	14,38
SUPERIOR		96,59	100,8	108,9
LOGEC50		1,292	0,6048	1,249
PENDIENTE DE HILL		-1,449	-2,526	-0,5931
EC50		19,58	4,026	17,76

FIG. 4

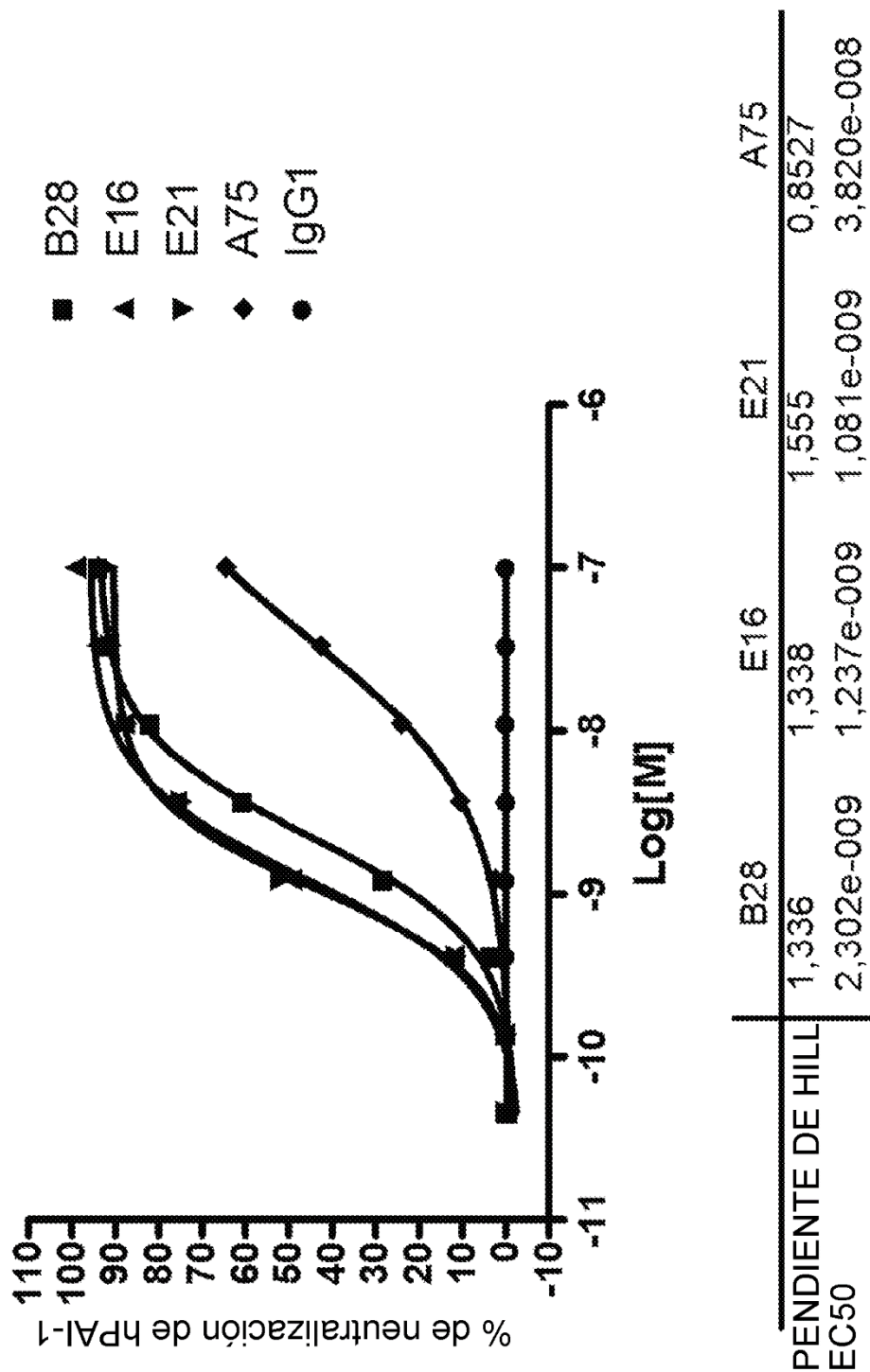
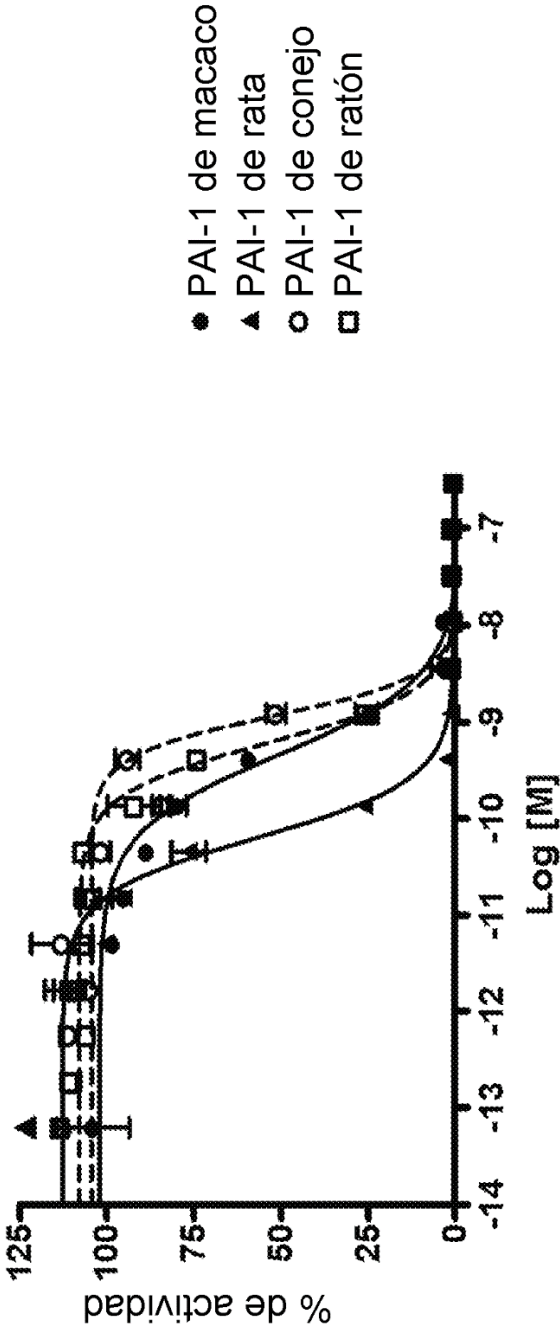


FIG. 5

% de actividad de 1,4 nM de tPA frente a PAI-1 de ratón, de macaco, de rata, y de conejo



	PAI-1 de macaco	PAI-1 de rata	PAI-1 de conejo	PAI-1 de ratón
PENDIENTE DE HILL	-1,087	-1,461	-2,079	-1,606
EC50	4,632e-010	6,425e-011	1,169e-009	6,143e-010

FIG. 6

% de neutralización de 2,8 nM de PAI-1 de macaco y 2,8 nM de PAI-1 de ratón frente a los mAb IMA-33B8 y A44

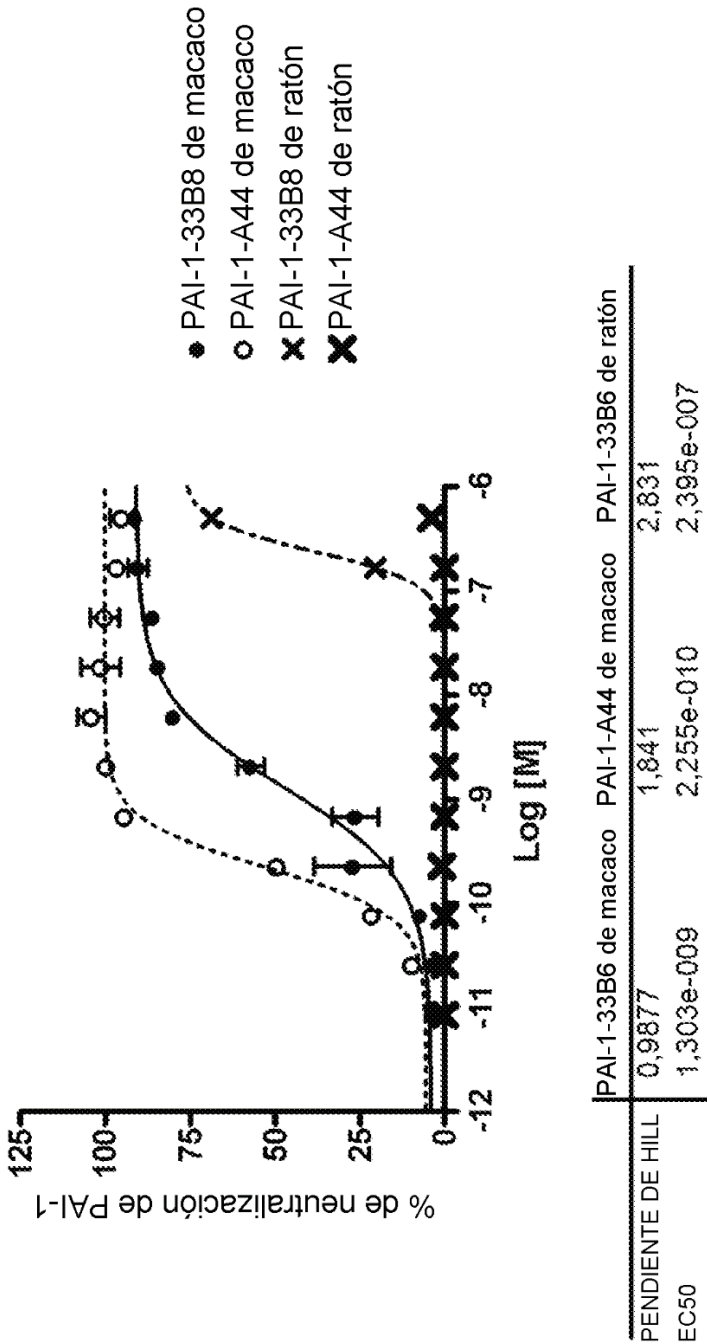


FIG. 7

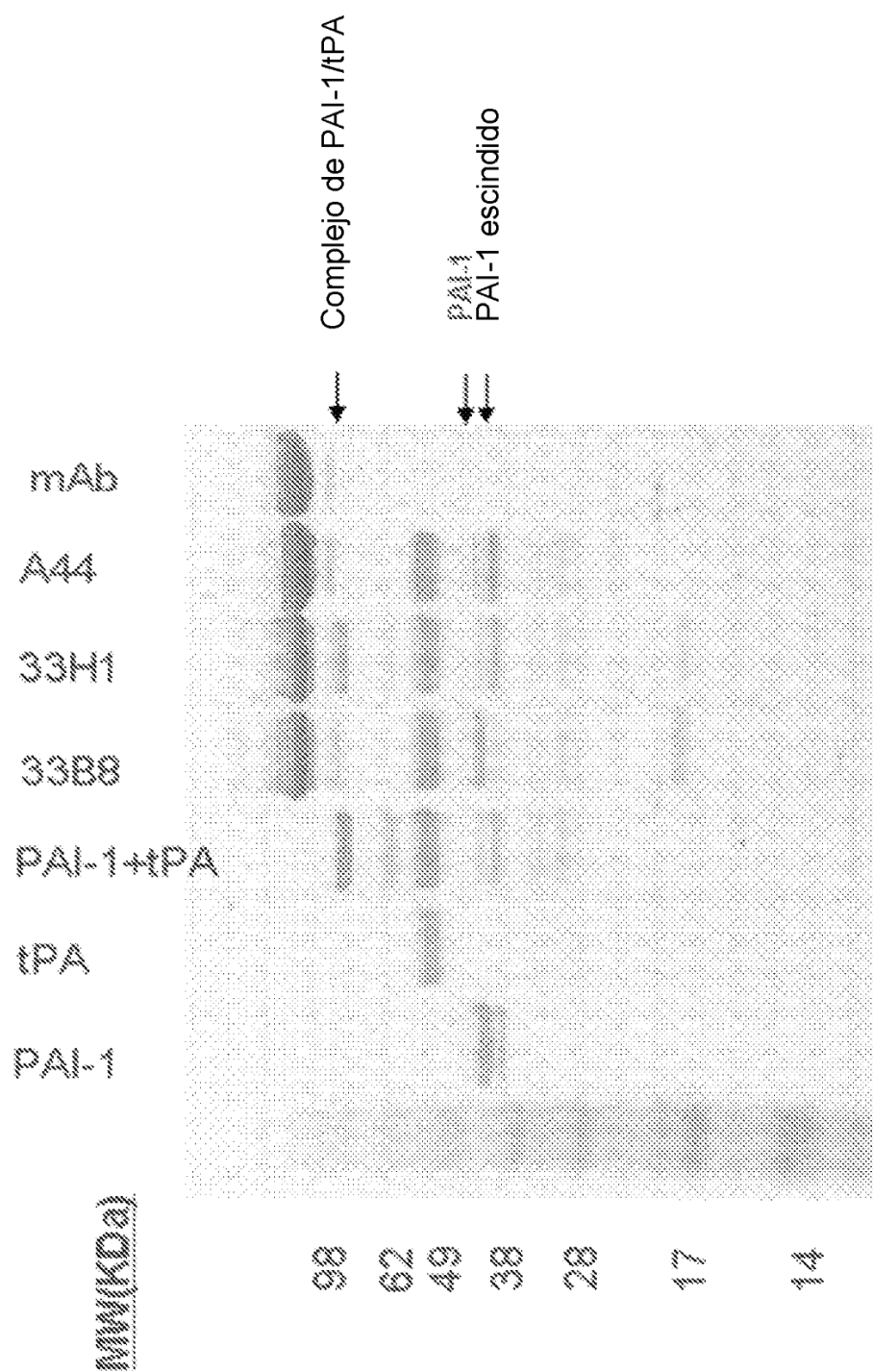


FIG. 8

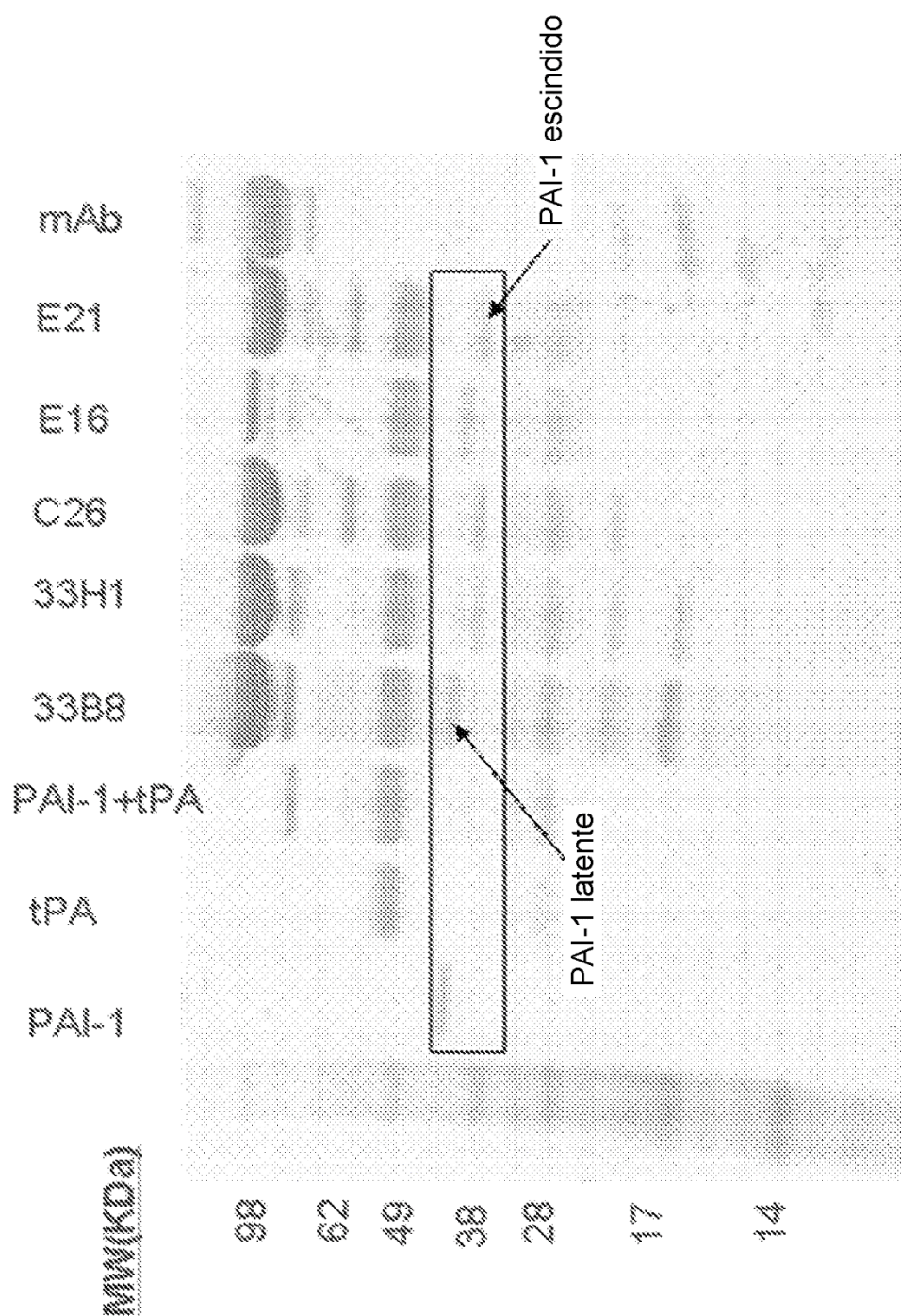


FIG. 9

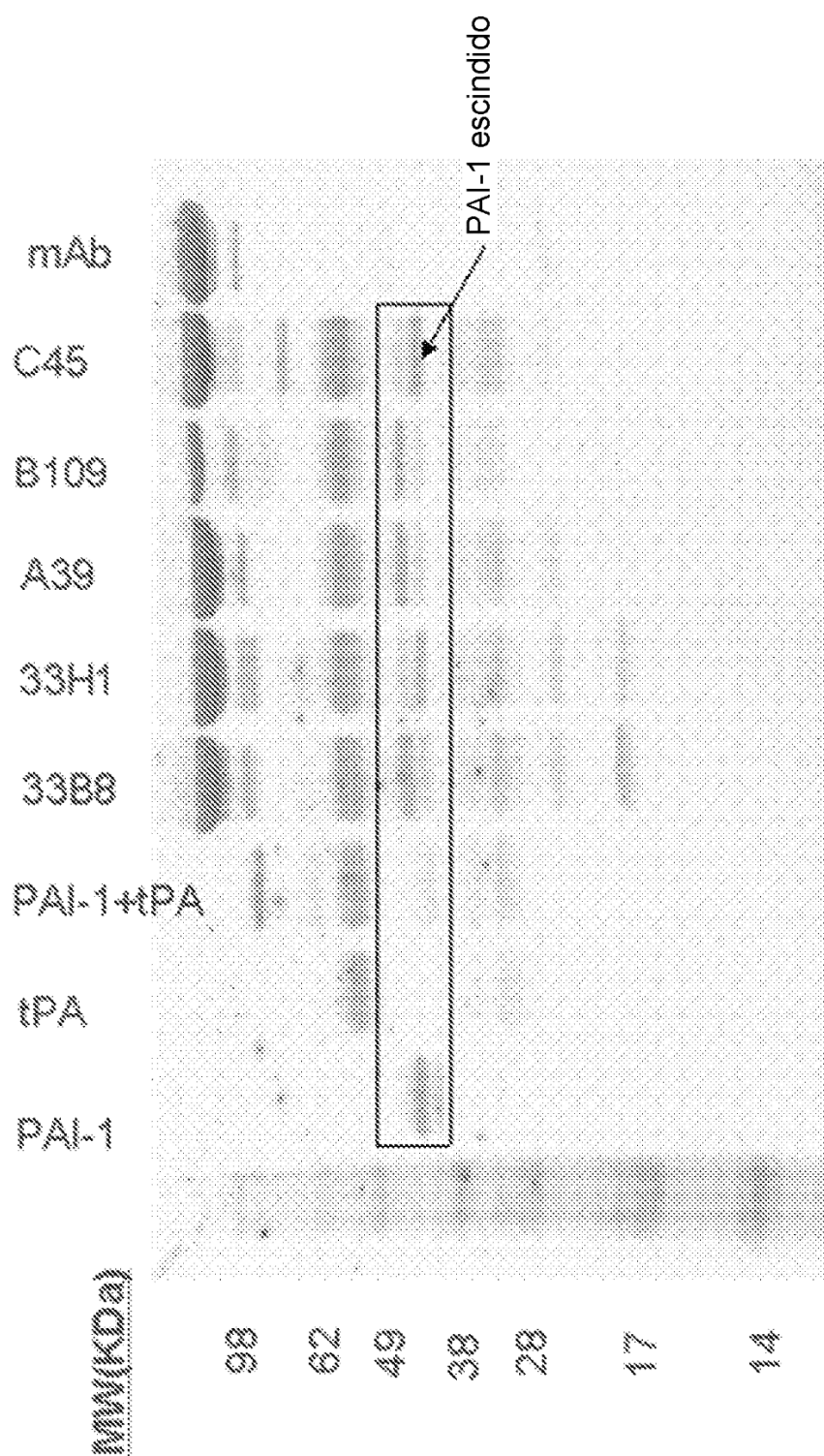


FIG. 10

## Alineación de VL

A105: DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPQRLISLVSK  
 A39: DIQMTSPASLSASVGETVTITCRASENIY-----SYLAWYHQKQKSPQLLYVNAKT  
 A44: DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWLQKQKSPKTLIYRANR  
 A71: DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSK  
 A75: DVVMTQTPLTSLVTIGQPASI-CKSSQSLDSEKTYLNWLFQRPQSPKRLIYLVCK  
 B109: DIVMTQSHKEMSTAGDRVSI PCKASQDVS-----SAVAWYQKQKLGQSPKLLIYSASF  
 B28: DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVY-----SYLAWYQKQKQKSPQLLYVNAKT  
 C45: DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIN-----SYLSWFQKQKSPKTLIYRANR  
 E16: DIVMTQSHKEMSTSVGDRVNIITCKASQDVS-----TAVGWYQKQKSPKLLIYSASN  
 E21: DIQMTQTSSLSASLGDRTVITISCRASQDIS-----NYLWNWYQKQKPDGTVKLLIYTSR

A105: LDGVPDRFTGSGSGTDFTLKLSRVEGADLGVIYCWQDRHFPRTEFGGKLEIKRAD  
 A39: LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNKSLOPEDEGTFYCQHRYGSPWTFGGTKLEIKRAD  
 A44: SVDGVPDRFTGSGSGGQDYSLTISSEYEDMGIIYCYDQYDEFFPTFGGKLEIKRAD  
 A71: LDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQDTHFFPTFGGKLEIKRAD  
 A75: LDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEGEDLGVIYCWQGSHPPTFGGKLEIKRAD  
 B109: RYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEADLAVIYCCQHYSSPYTFGGTNLEIKRAD  
 B28: LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLQPEDEGSIYCCQHHYGTPTFGGKVEIKRAD  
 C45: LVDGVPDRFTGSGSGGQDYSLTISSEYEDMGIIYCYDQYDEFFPTFGGKLEIK----  
 E16: RHTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEADLAVIYCCQHYSSPWTFGGKLEIK----  
 E21: LHSGVPSRFSGSGSGTQDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLTPWTFGGKLEIK----

FIG. 11

## Alineación de VH

```

A105: QVQLQQSGAEIMKPGASVKISKATGFTFSYIEWVKQRPG--GLEWIGEILPGSGST
A39:  QVQLQQSGAEIMKPGASVKISKATGYTENIYWIQWVKQRPGH-----GLEWIGEILPGSN-T
A44:  EMQLQESGSPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSMTNGYNWIRKFGN-----KLEYMGYIT-YSGST
A71:  QVQLQQSGAEIMKPGASVKISKATGFTFSYIEWIKQRPGH-----GLDWIGEILPGSGNT
A75:  QGQLQQSGAEIMKPGASVKISKASGFTFSYIWLKQRPGH-----GLEWIAEILPGSGLT
B109: EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSTSYMMHWVKQRPGQGLEWMGAIYPCNSGQGLDWIGAIYPCNSDT
B28:  QVQLQQSGAEIMKPGASVKISKATGYTFSISWIKQRPG--GLEWIGNILPGSGGA
C45:  QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSKASGYAFTNLYIEWIKQRPG-----GLEWIGVIHPGSGVT
E16:  EVKLVEGCGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQTEK-----GLGWVASLRTGCGN-T
E21:  EVQLQQSGAEILVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMMHWVKQRPEQ-----GLEWIGWIDPENGDT

A105: NYNEKFKGKATTTADTSSNTAFMQLSSLTSEDSAVYYCARG--GLYDLDYWGQGTTILTVSSAKTTTP
A39:  NYNEKFKDKATTTADSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGI-GIRGALDYWGQGTSTVTVSSAKTTTP
A44:  YNPSLKGRISITHTNTSKNQYIQLSSVTETDFAFYCARWHY-GSPYFDYWGQGTTLTVSSAKTTTP
A71:  NYNEKFKGKATTTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARG--GLYNLDYWGQGTTLTVSSAKTTTP
A75:  NYNEIFRGKATTTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARG--GLIYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTAP
B109: TYNQKEEDKAKLTAVASASTAYMEVSSLTNEEDSAVYYCTRGLRRMGAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTTP
B28:  NYNEKFKGKATTTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARLST-GTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTTP
C45:  NYNEKFKGKAILTADKSSSTAYMQLSSLTSDSDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGTSTVTVSS-----
E16:  YYSDSVKGRFTISRDNDRNLIYLQMSSLTSEDTAVYYCARG--LRHWGYFDVWGAGTTVTVSS-----
E21:  EYDPKFKQAKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCMYG---NYPYFDYWGQGTTLTVSS-----

```

FIG. 12

Alineación de LC de A44 con vk1:

A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
VK1: DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA  
A44: ANRSVDGVPS RFGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG  
VK1: ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDLATYYCQQ SYSTPPTFGQ  
A44: GTKLEIK  
VK1: GTKVEIK

Alineación de LC de A44 con vlambda3:

A44: DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITXKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
VL3: -SYELTQPPS VSVSPGQTAS ITXSGDKLGD KYASWYQQKP GQSPVLVIYQ  
A44: ANRSVDGVPS RFGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYXLQ YDEFPPTFGG  
VL3: DSKRPSGIPE RFGSNSGNT ATLTISGTQA MDEADYYXQA WDSAVVFGG  
A44: GTKLEIK  
VL3: GTKLTVL

**FIG. 13**

## Alineación de HC de A44 con vh2:

A44: EMQLQESGPS LVKPSQTL<sup>S</sup>L TCSVTGDSMT --NGYWNWIR KFPGNKLEYM  
 VH2: QVTLKESGPT LVKPTQT<sup>L</sup>TL TCTFSGFSL<sup>S</sup> TSGVGVGWIR QPFGKALEWL  
 A44: GYITYSGSTY YNPSLKGRIS ITRNTSKNQY YLQLSSVTTE DTATYYCARW  
 VH2: ARIDWDDDKY YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARM  
 A44: HYGSPYYFDY WGQGTTLTVSS  
 VH2: GFTG-TYFDY WGQGTTLTVSS

## Alineación de HC de A44 con vh4:

A44: EMQLQESGPS LVKPSQTL<sup>S</sup>L TXSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGNKLEYMGY  
 VH4: QVQLQESGPG LVKPSETL<sup>S</sup>L T<sup>X</sup>TVSGGSIS SY<sup>Y</sup>WSWIRQP PGKGLEWIGY  
 A44: IYISGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQY<sup>L</sup> QLSSVTTEDT ATYYXARWHY  
 VH4: IYISGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQESL KLSVTAADT AVYYXARGDS  
 A44: GSPYYFDYWG QGTTLTVSS  
 VH4: SG-YYFDYWG QGTTLTVSS

FIG. 14

[illegible]

Clon	Constructo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
MuA44-VH	Parental	E	M	Q	L	Q	E	S	G	P	S	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F					
MuA44-VH	HC1a	E	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F					
MuA44-VH	HC1b	E	M	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F					
MuA44-VH	HC2a	E	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F					
MuA44-VH	HC2b	E	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	T	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	K	F					
MuA44-VH	HC3	Q	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	F					
MuA44-VH	HC4	Q	M	T	L	K	E	S	G	P	T	L	V	K	P	T	Q	T	L	S	L	T	C	S	V	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	F					
MuA44-VH	HC5a	Q	M	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	P				
MuA44-VH	HC5b	Q	M	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	P					
MuA44-VH	HC5c	Q	M	Q	L	Q	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	A	I	S	G	D	S	M	T	N	G	Y	W	N	W	I	R	Q	S				

Clon	Constructo	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
MuA44-VH	Parental	P	G	N	K	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	Q				
MuA44-VH	HC1a	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T				
MuA44-VH	HC1b	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T				
MuA44-VH	HC2a	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T				
MuA44-VH	HC2b	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	S	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T				
MuA44-VH	HC3	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	T	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T				
MuA44-VH	HC4	P	G	K	A	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	G	R	I	T	I	T	R	N	T	S	K	N	Q	Y	Y	L	T				
MuA44-VH	HC5a	P	G	K	G	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	T	I	S	R	R	D	T	S	K	N	Q	Y	S	L	K			
MuA44-VH	HC5b	P	G	K	G	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	T	I	S	R	R	D	T	S	K	N	Q	Y	S	L	K			
MuA44-VH	HC5c	P	S	R	G	L	E	Y	M	G	Y	I	T	Y	S	G	S	T	Y	Y	A	V	S	V	K	S	R	I	T	I	N	R	D	T	S	K	N	Q	Y	S	L	K				

Clon	Constructo	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	
MuA44-VH	Parental	L	S	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
MuA44-VH	HC1a	L	S	S	V	T	T	V	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
MuA44-VH	HC1b	L	S	S	V	T	T	A	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
MuA44-VH	HC2a	L	S	S	V	T	T	V	E	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
MuA44-VH	HC2b	L	S	S	V	T	T	V	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
MuA44-VH	HC3	L	S	S	V	T	T	V	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
MuA44-VH	HC4	L	S	S	V	T	T	V	E	T	A	T	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	
MuA44-VH	HC5a	L	S	S	V	T	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
MuA44-VH	HC5b	L	S	S	V	T	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
MuA44-VH	HC5c	L	S	S	V	T	T	P	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	W	H	Y	G	S	P	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

FIG. 16

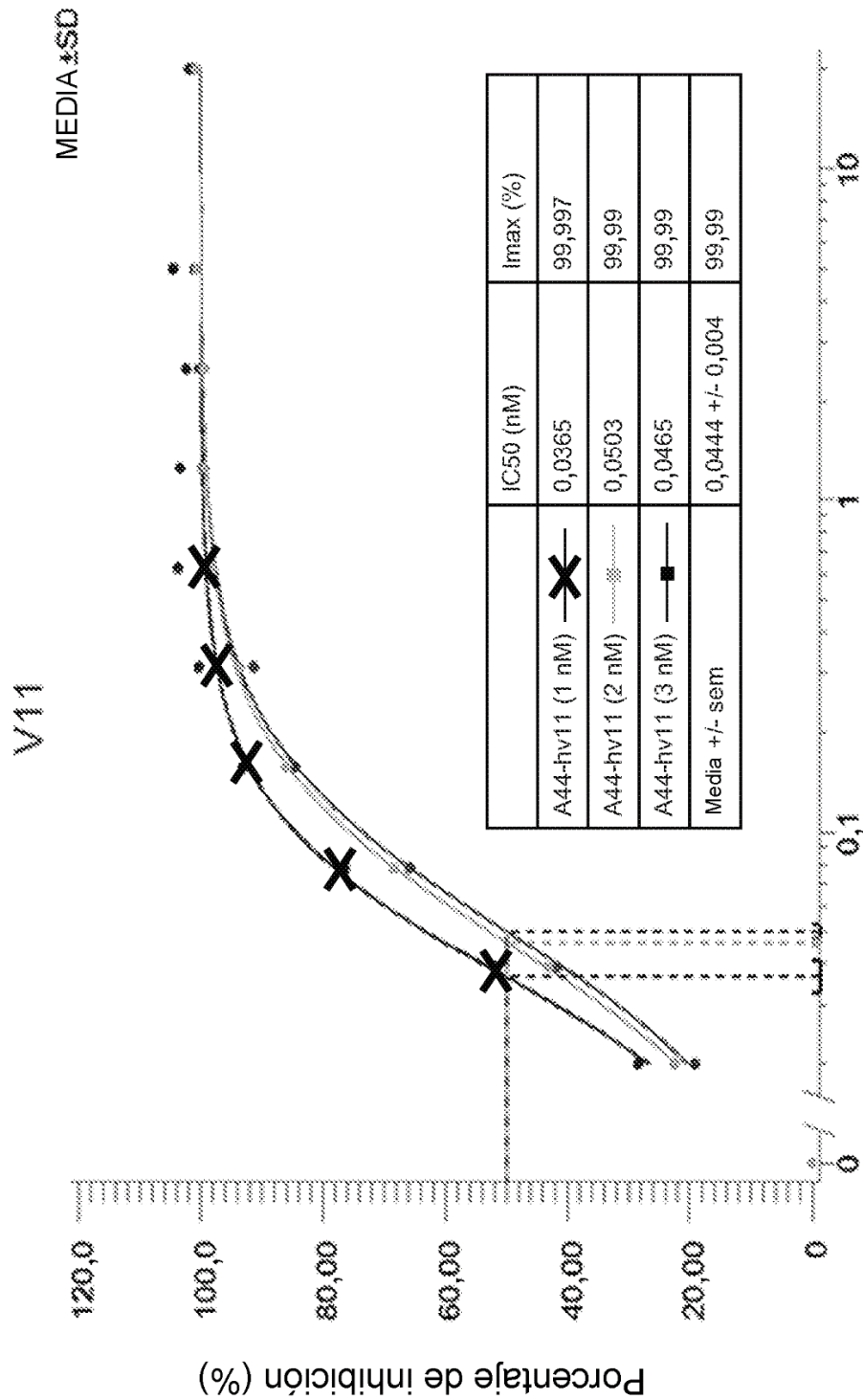


FIG. 17

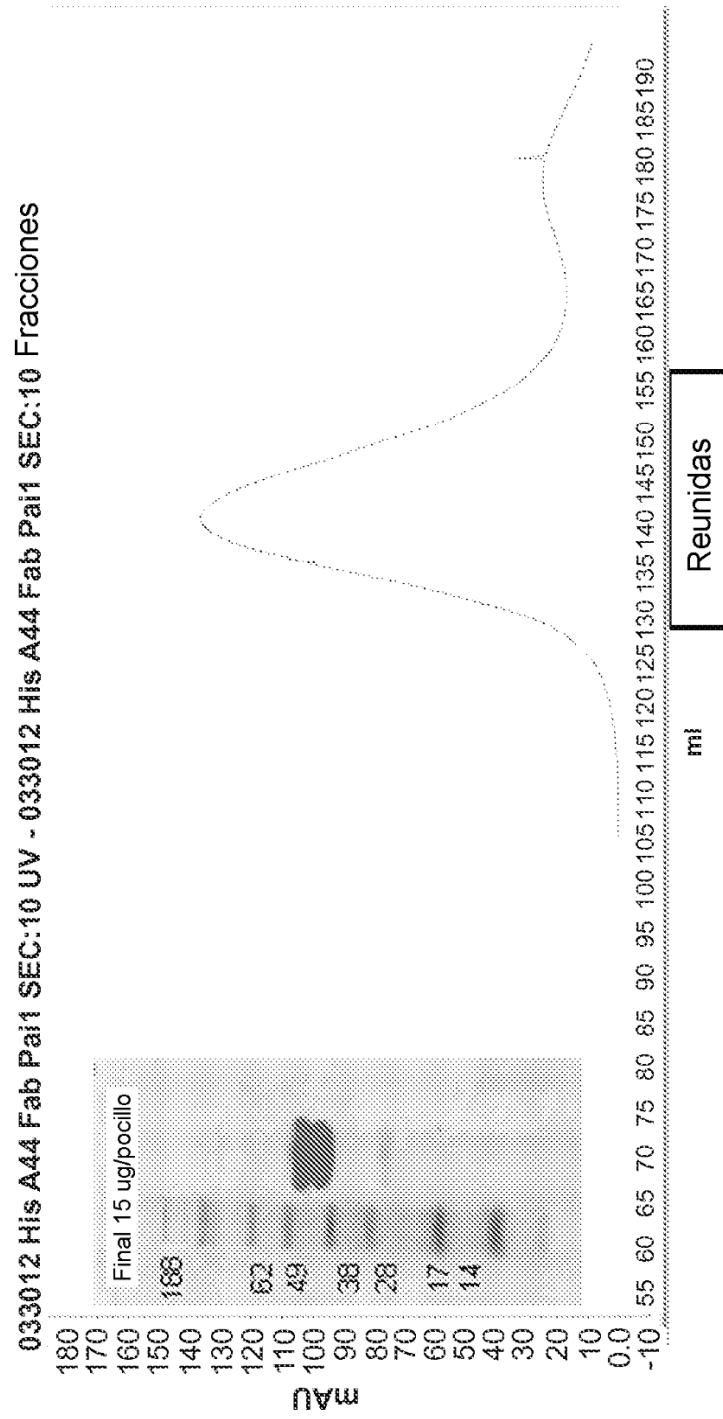
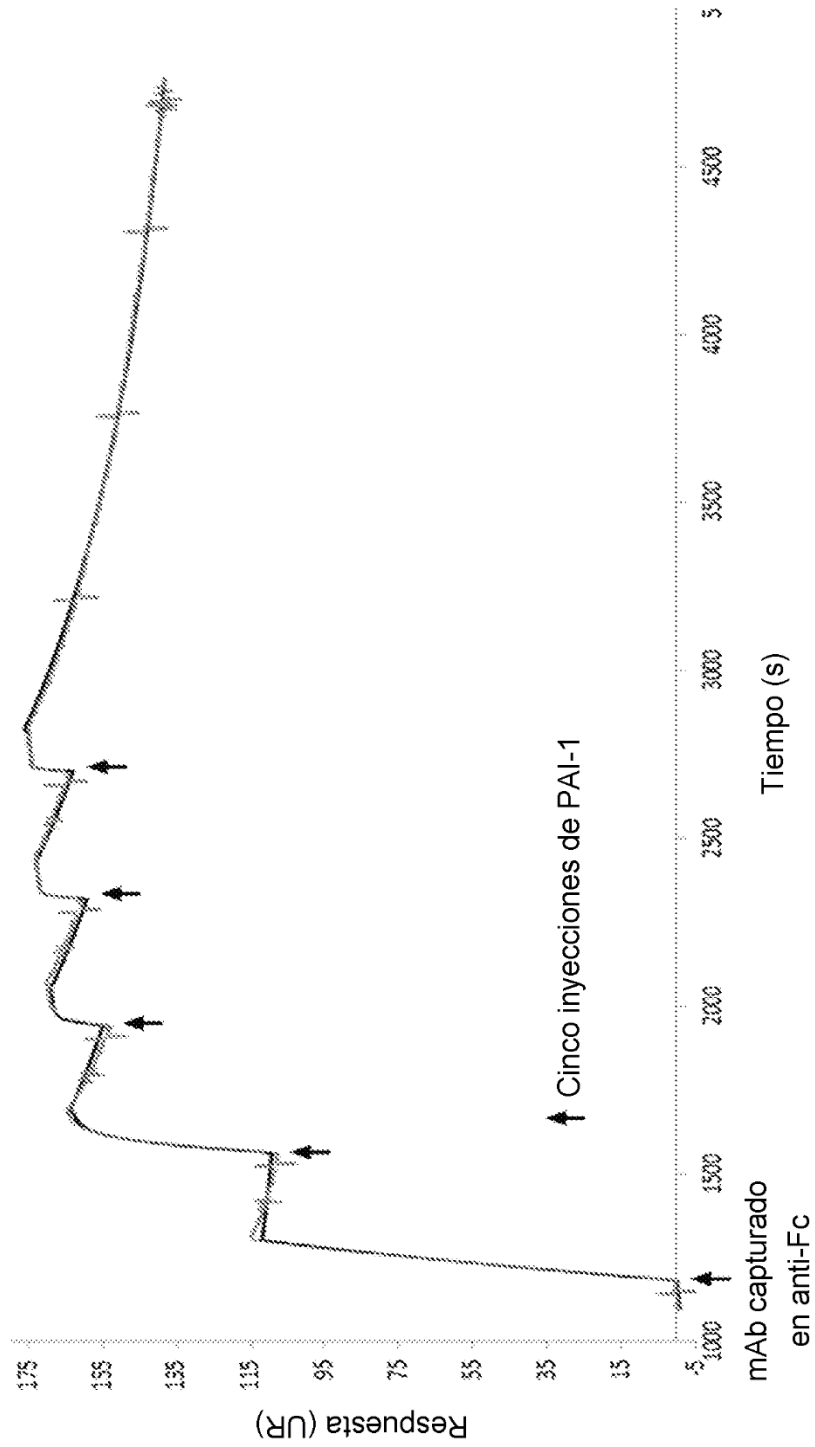


FIG. 18



**FIG. 19**

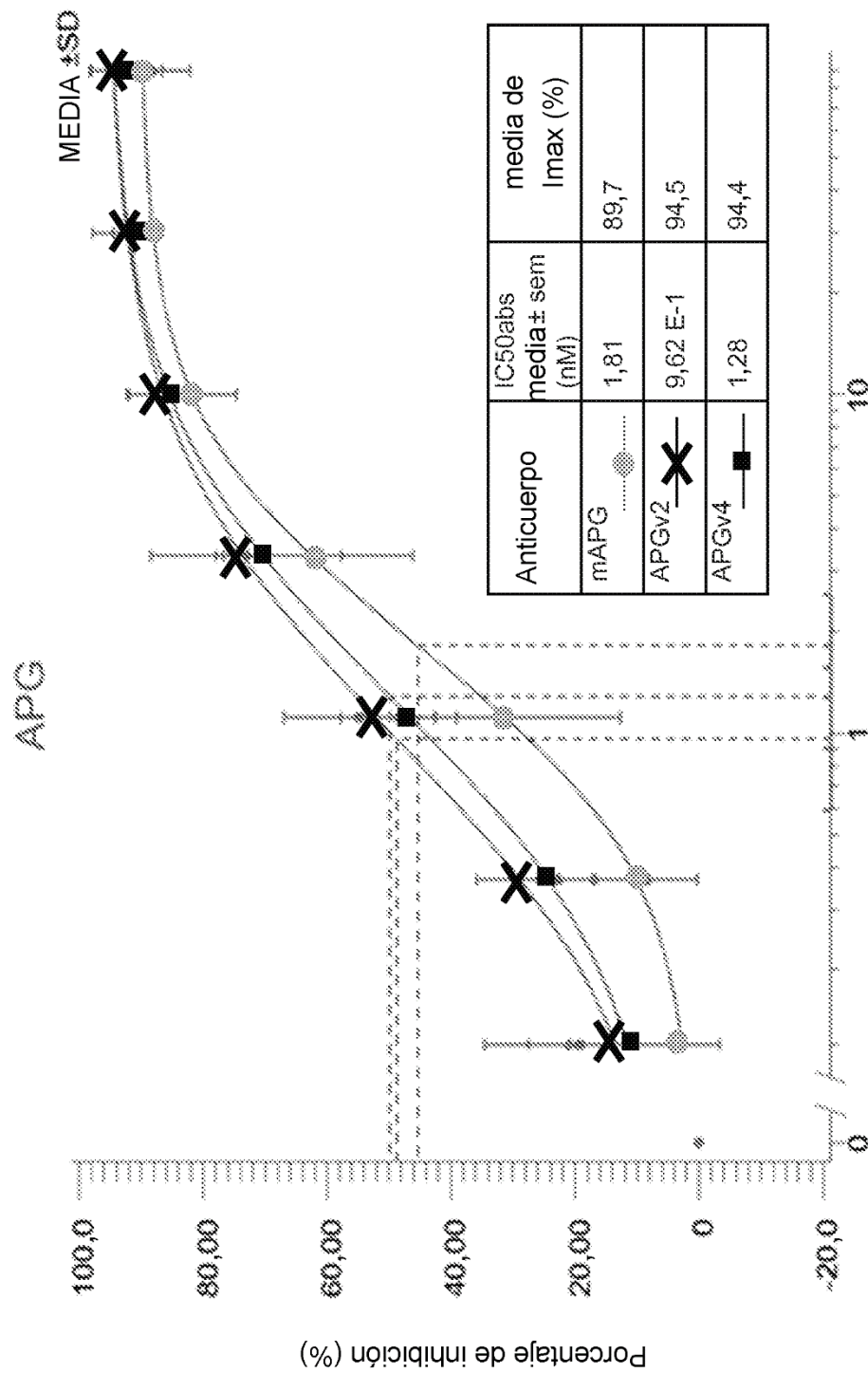
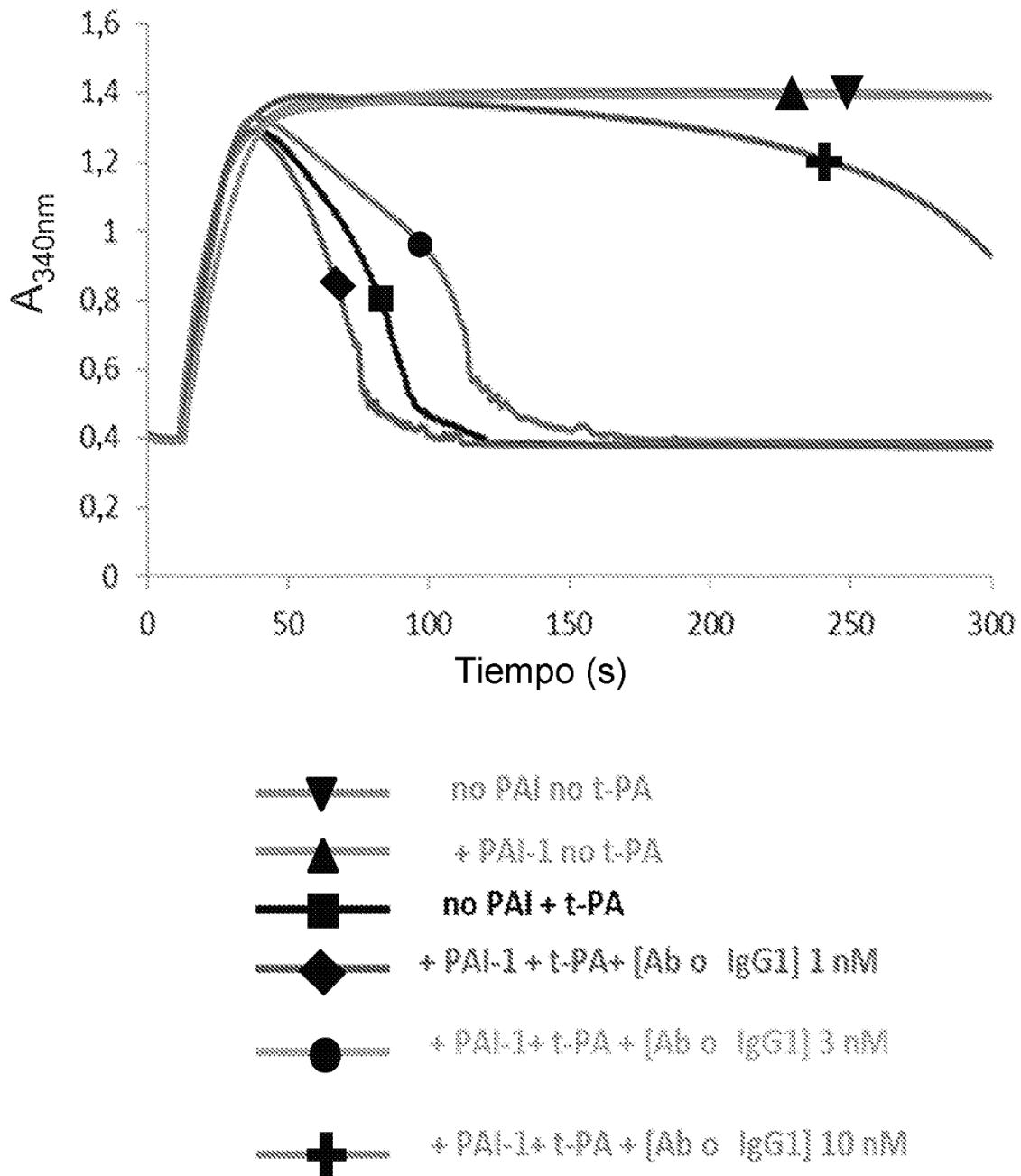
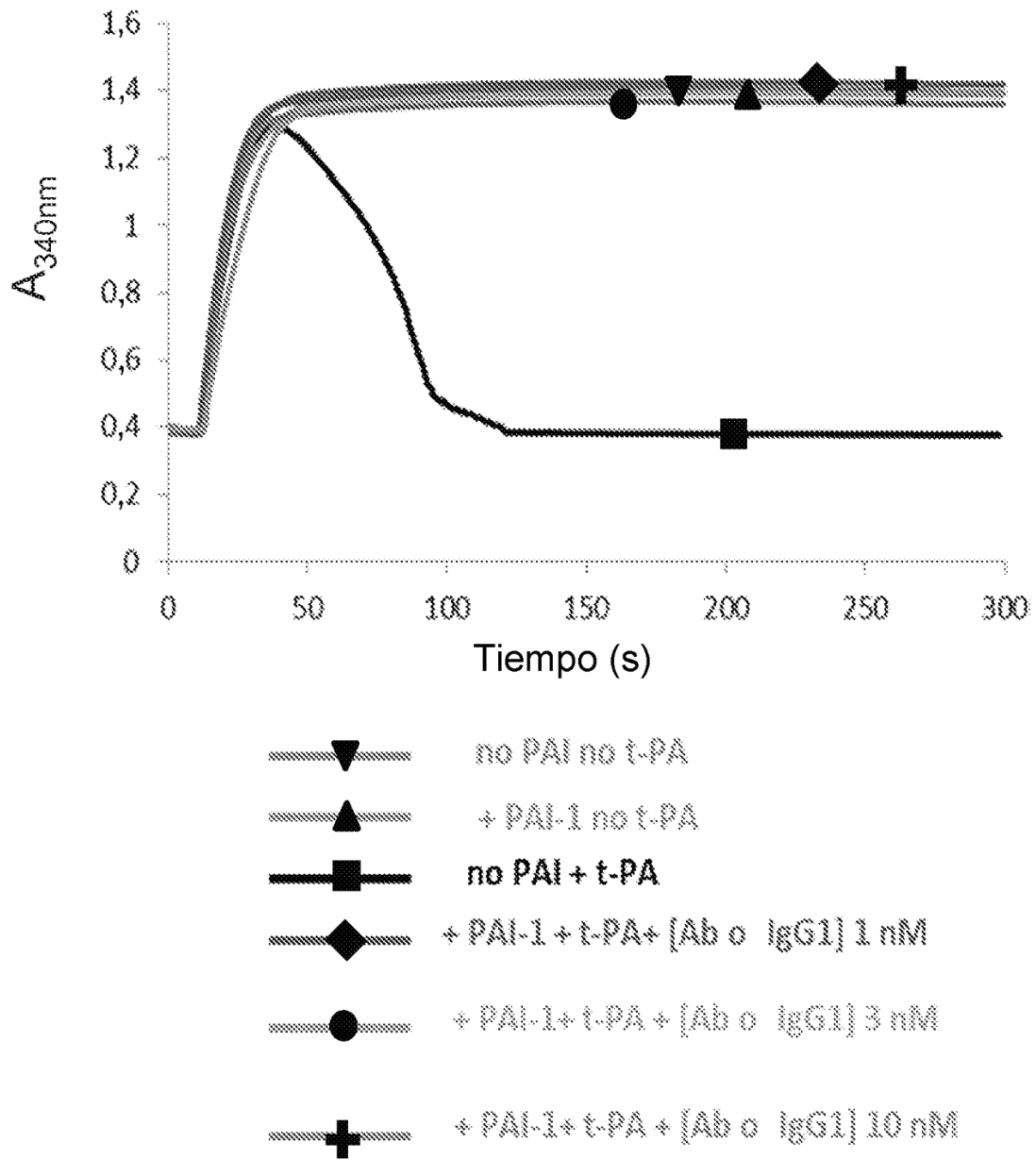


FIG. 20

# Efecto del anticuerpo anti-PAI-1 A44V11 sobre la restauración de la lisis de coágulos



# Efecto del isotipo IgG1 sobre la restauración de la lisis de coágulos



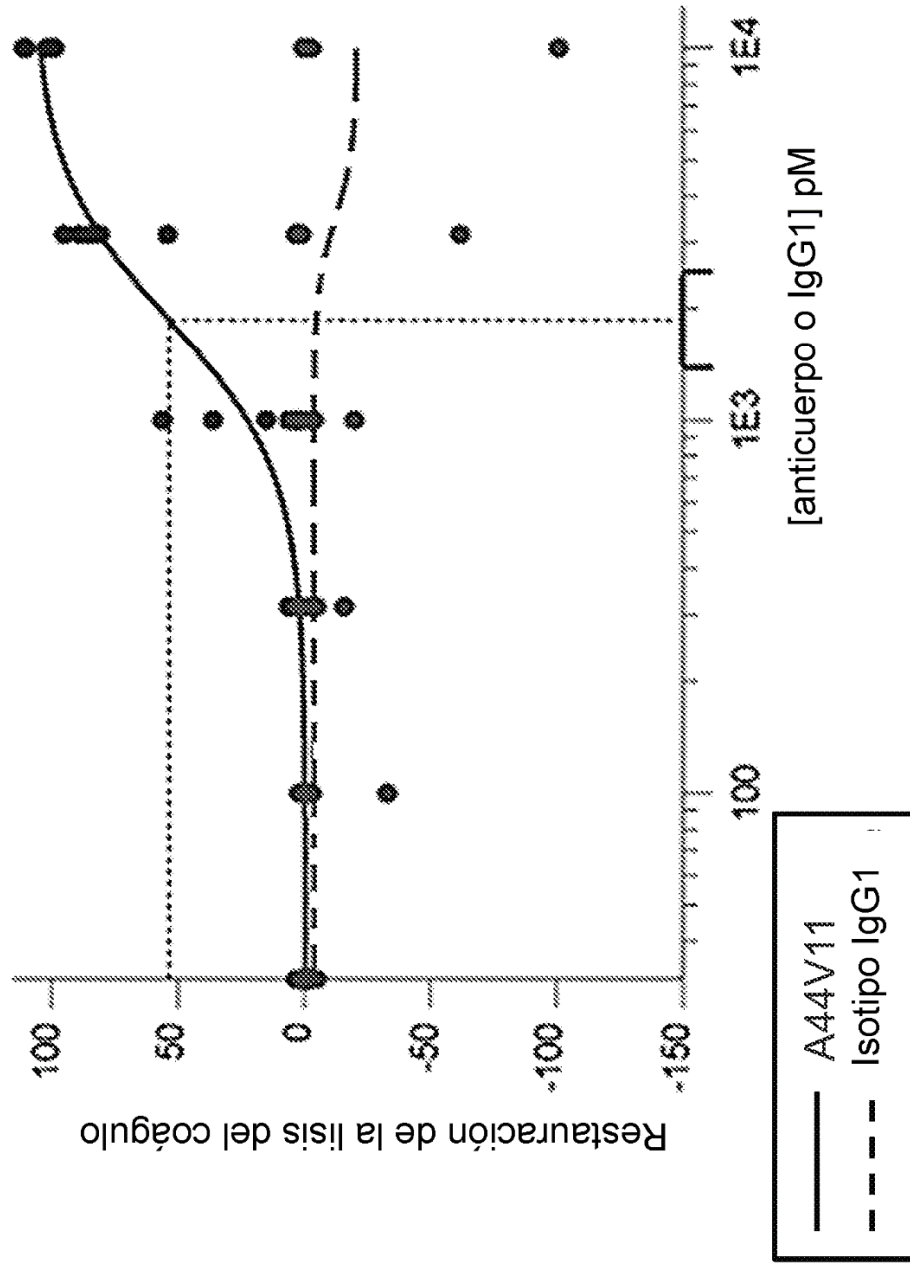


FIG. 23

Efecto del anticuerpo anti-PAI APG nativo y humanizado sobre la restauración de la lisis del coágulo

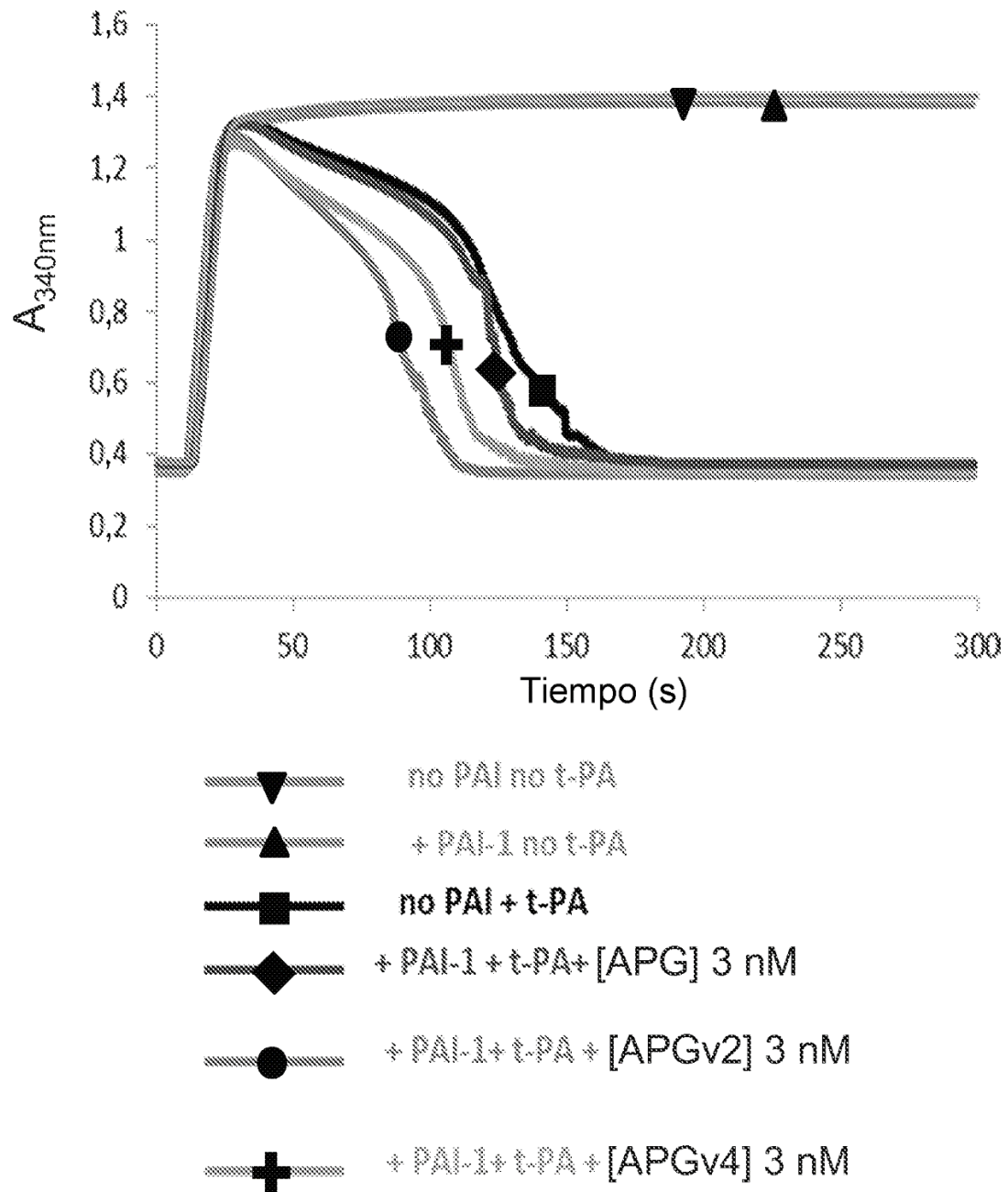


FIG. 24

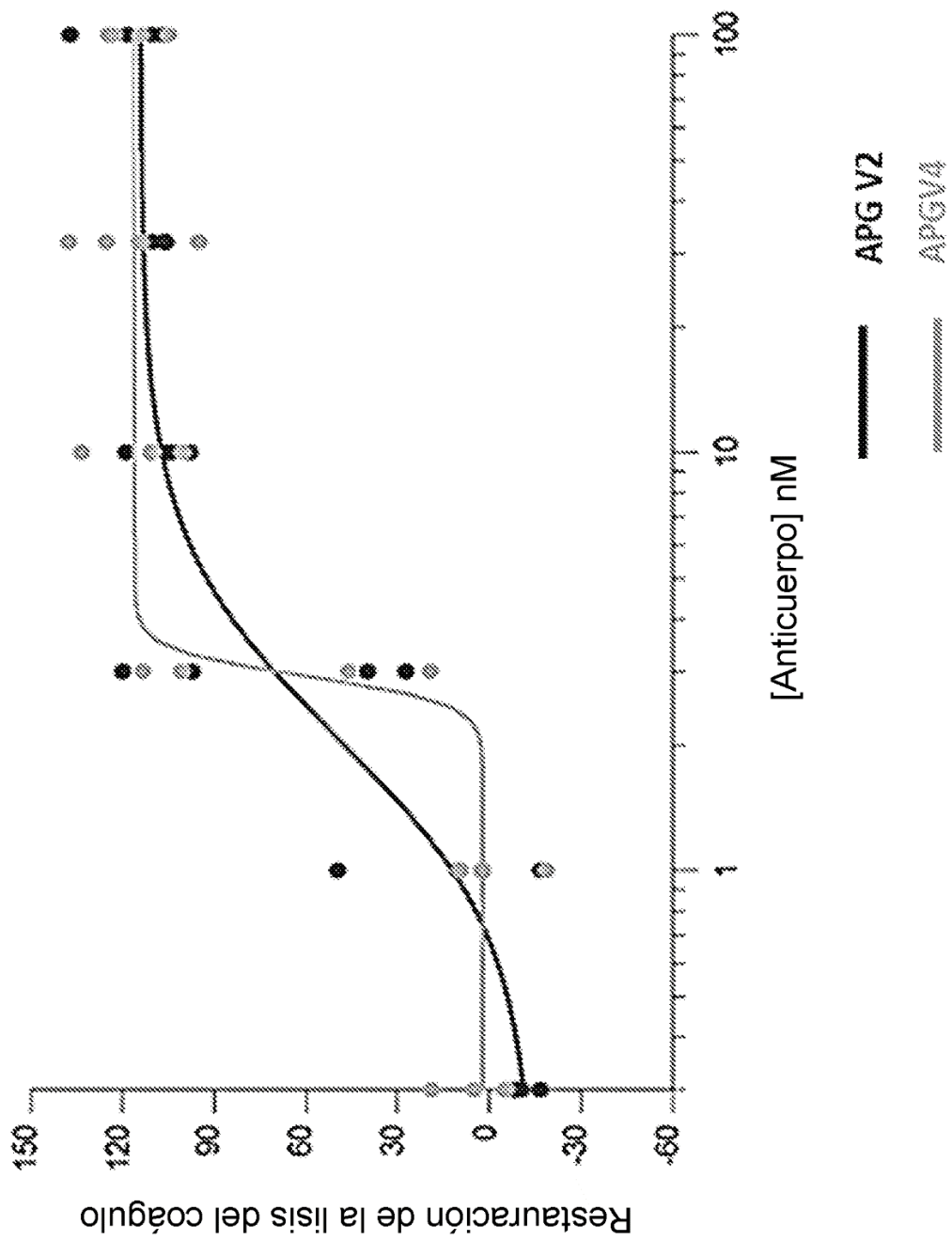


FIG. 25

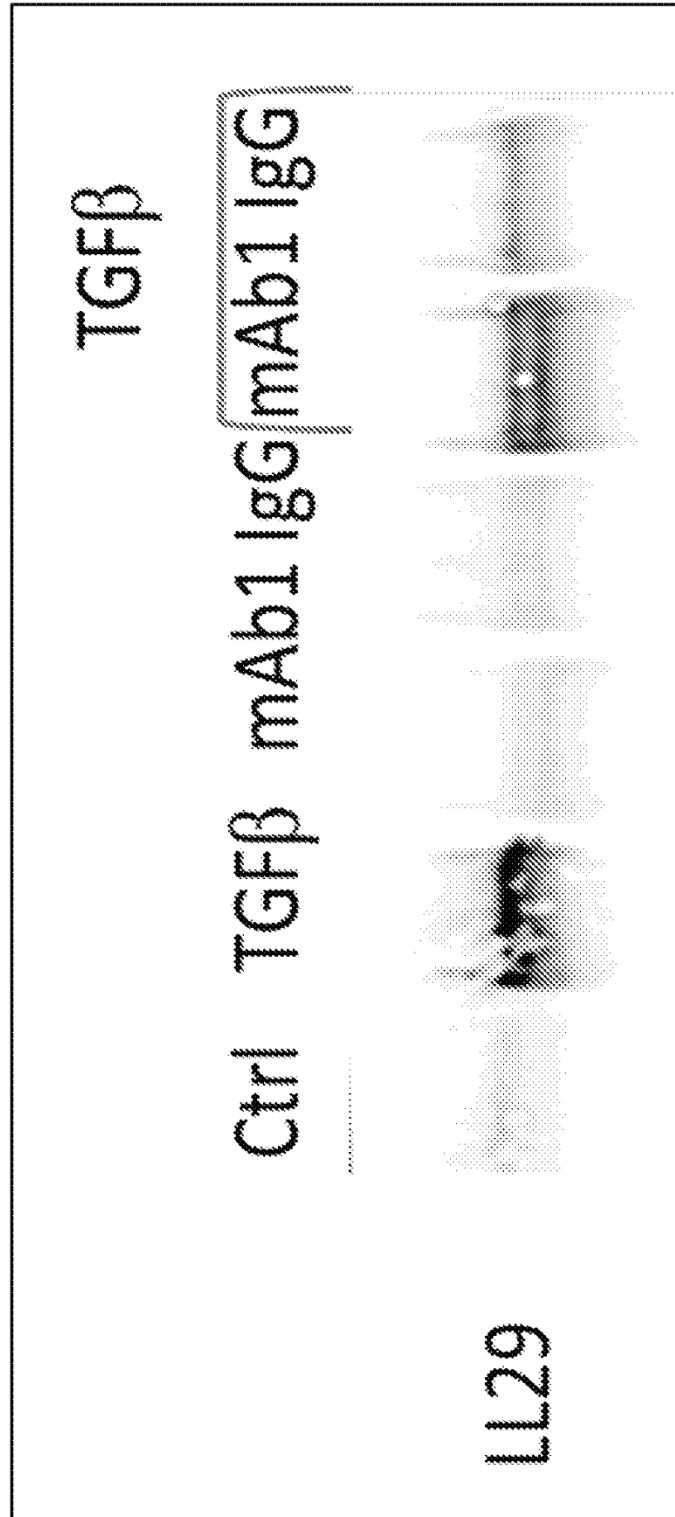


FIG. 26

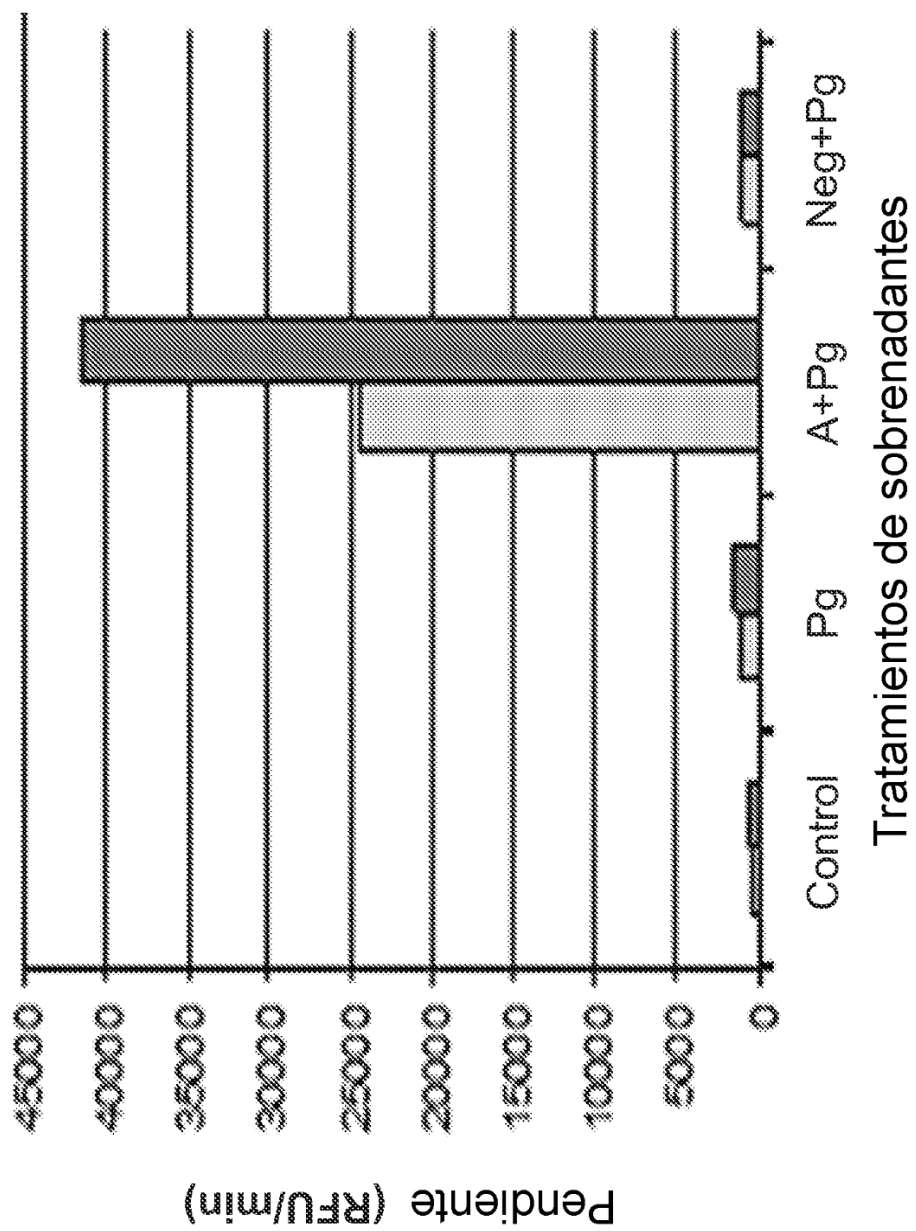
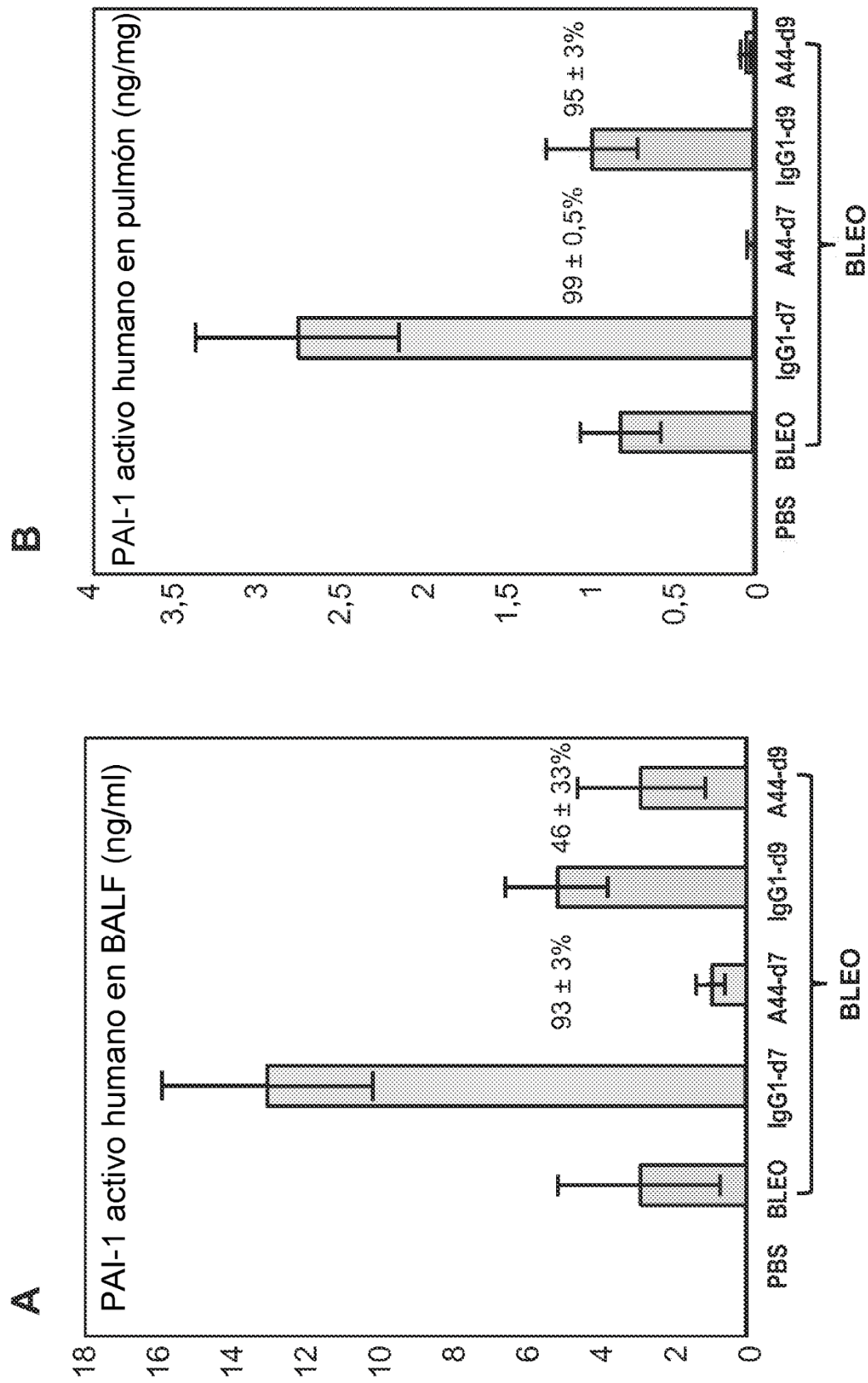
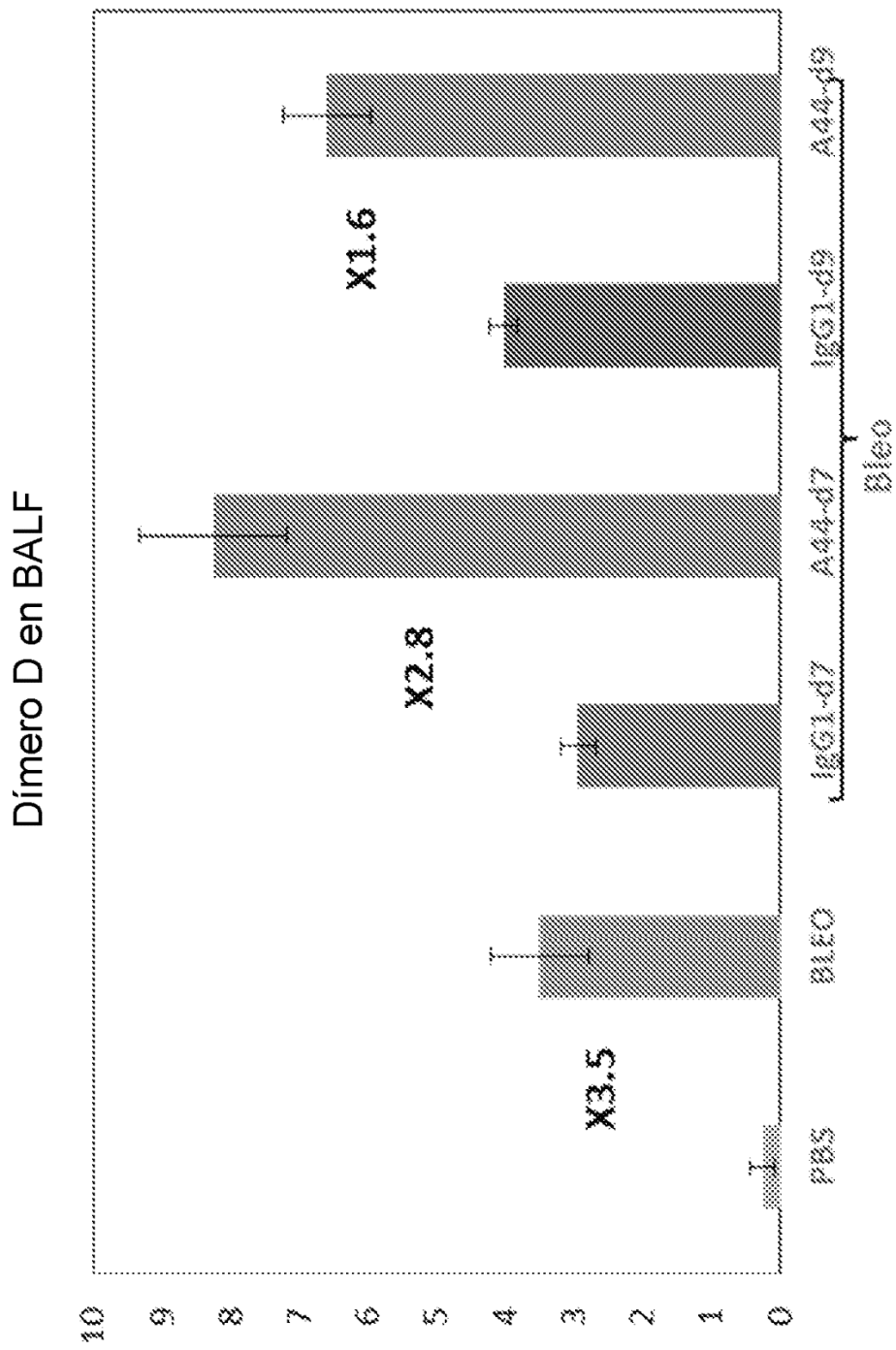


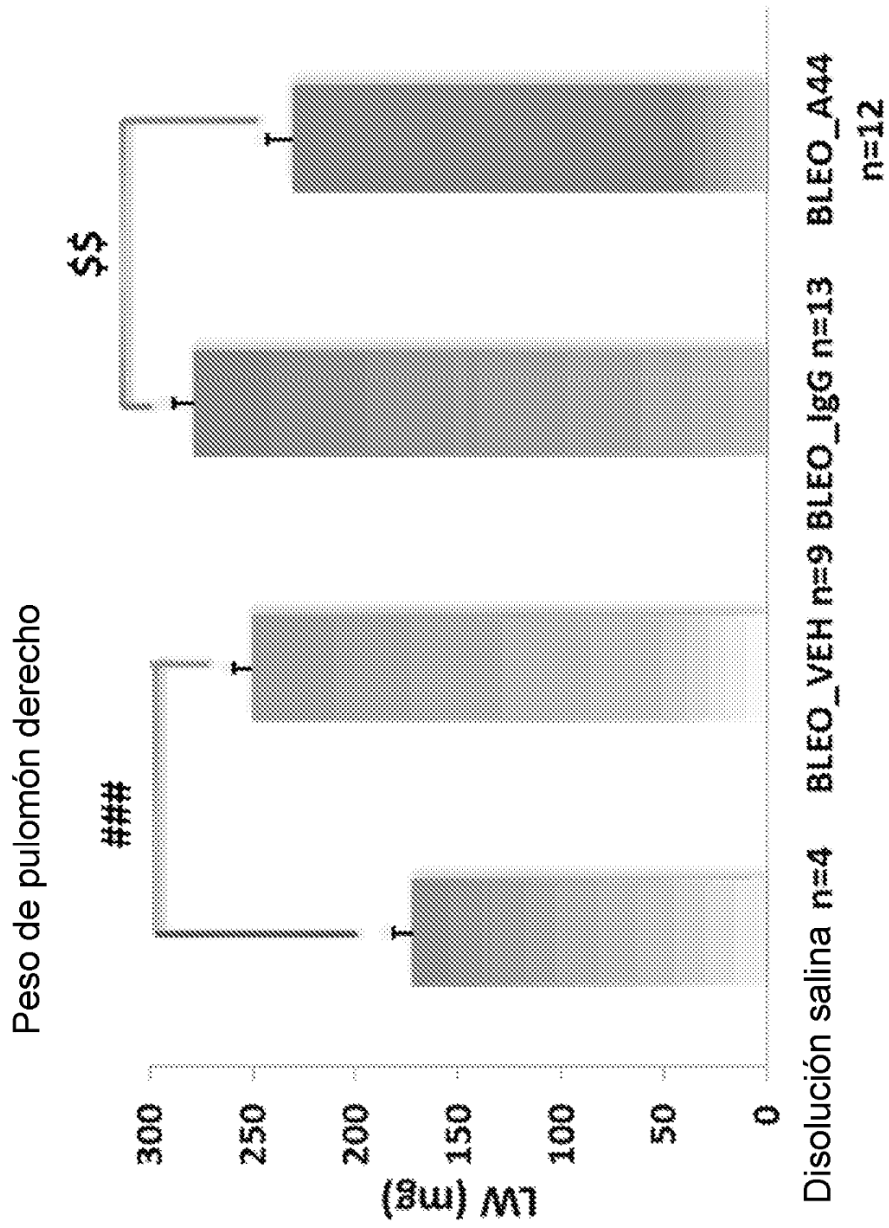
FIG. 27



**FIG. 28**



**FIG. 29**



ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Newman-Keuls  
 ### :  $p < 0,001$  frente a PBS    \$\$:  $p < 0,01$  frente a BLEO\_IgG1

FIG. 30

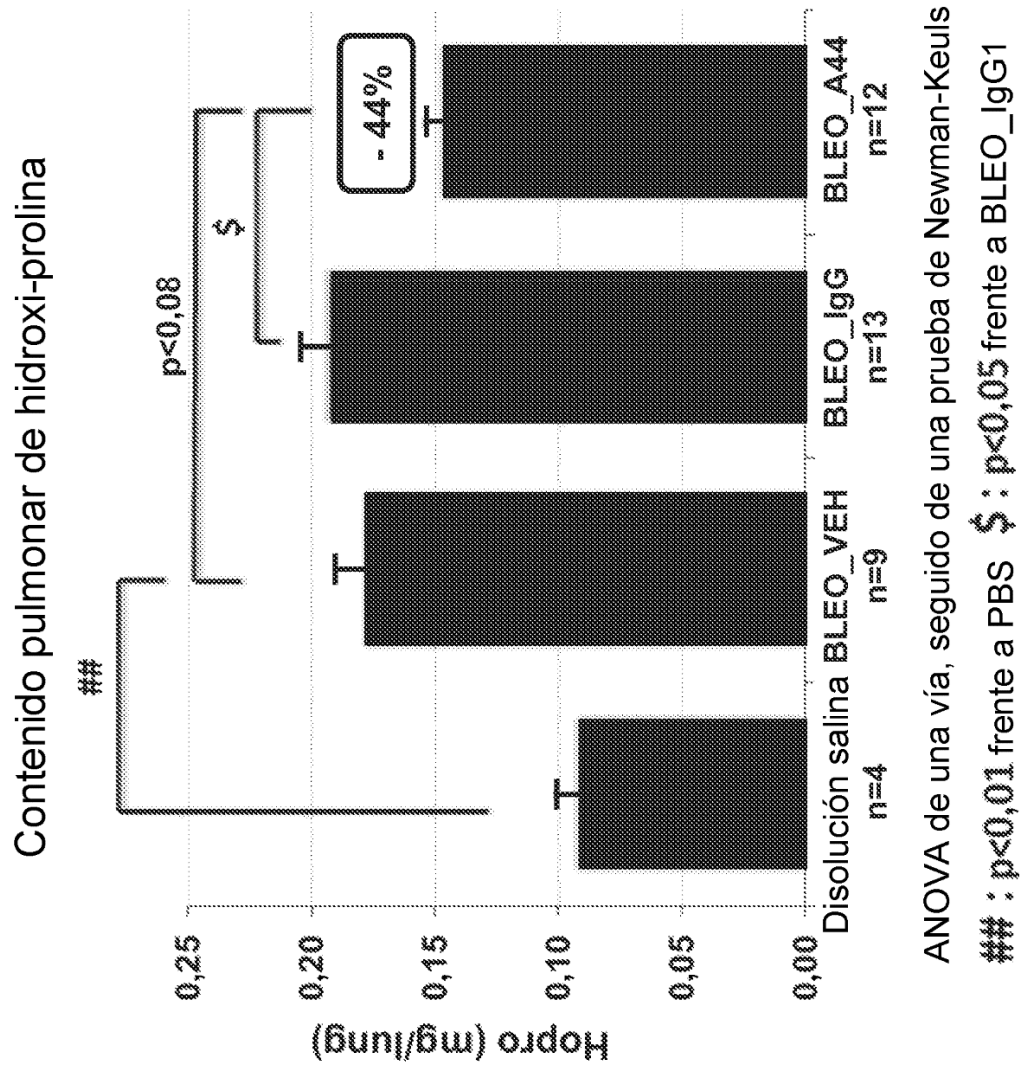


FIG. 31

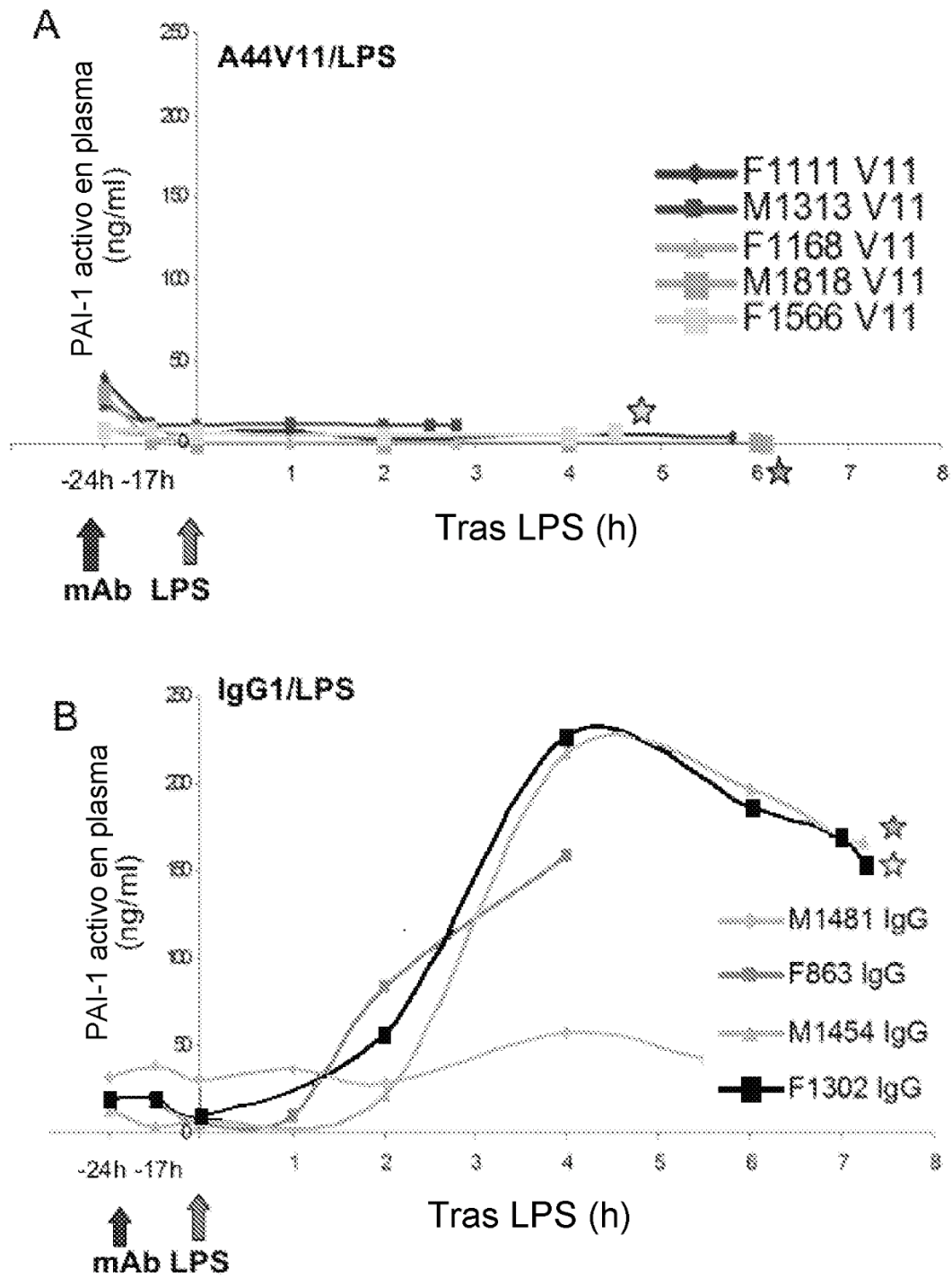


FIG. 32

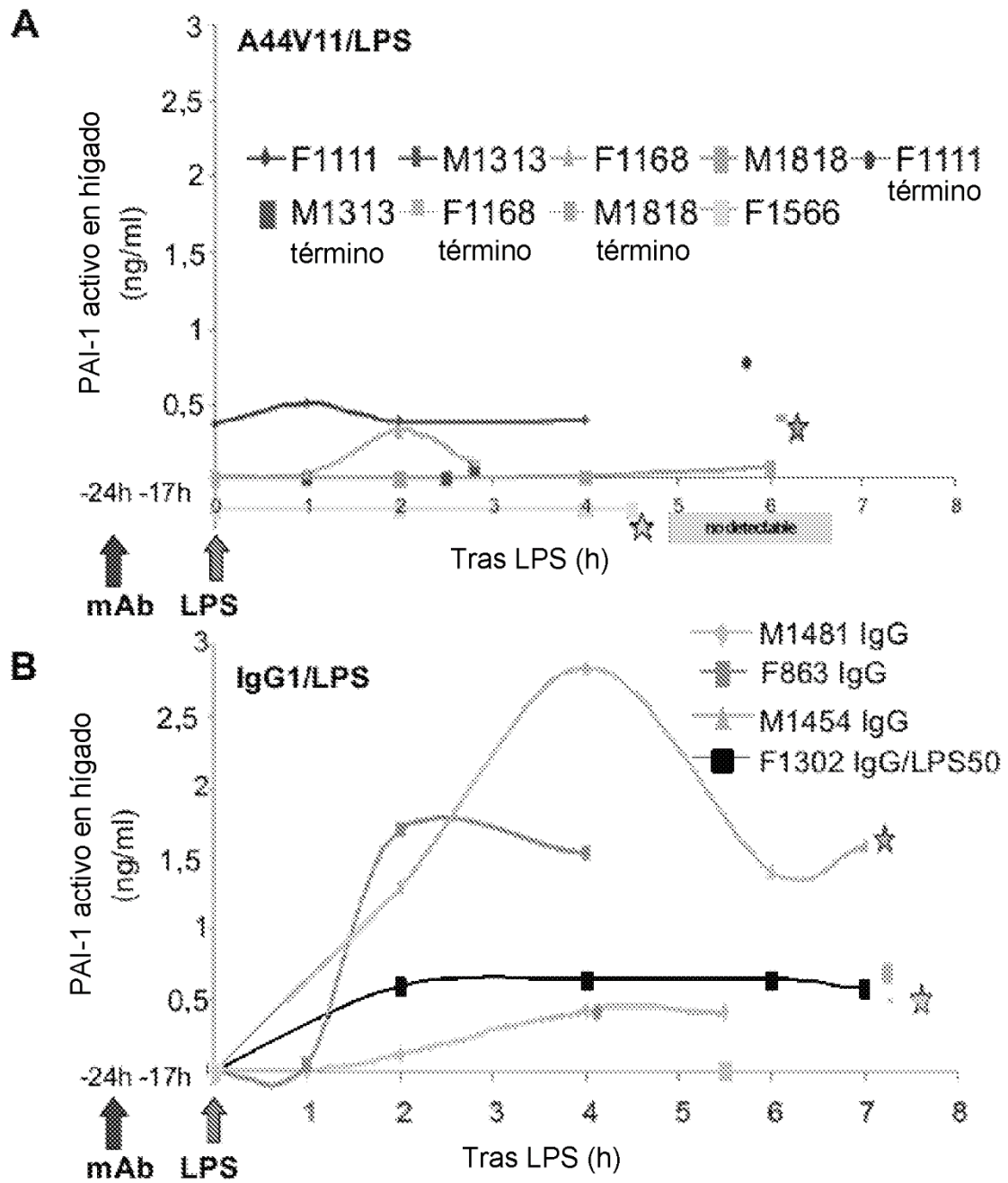
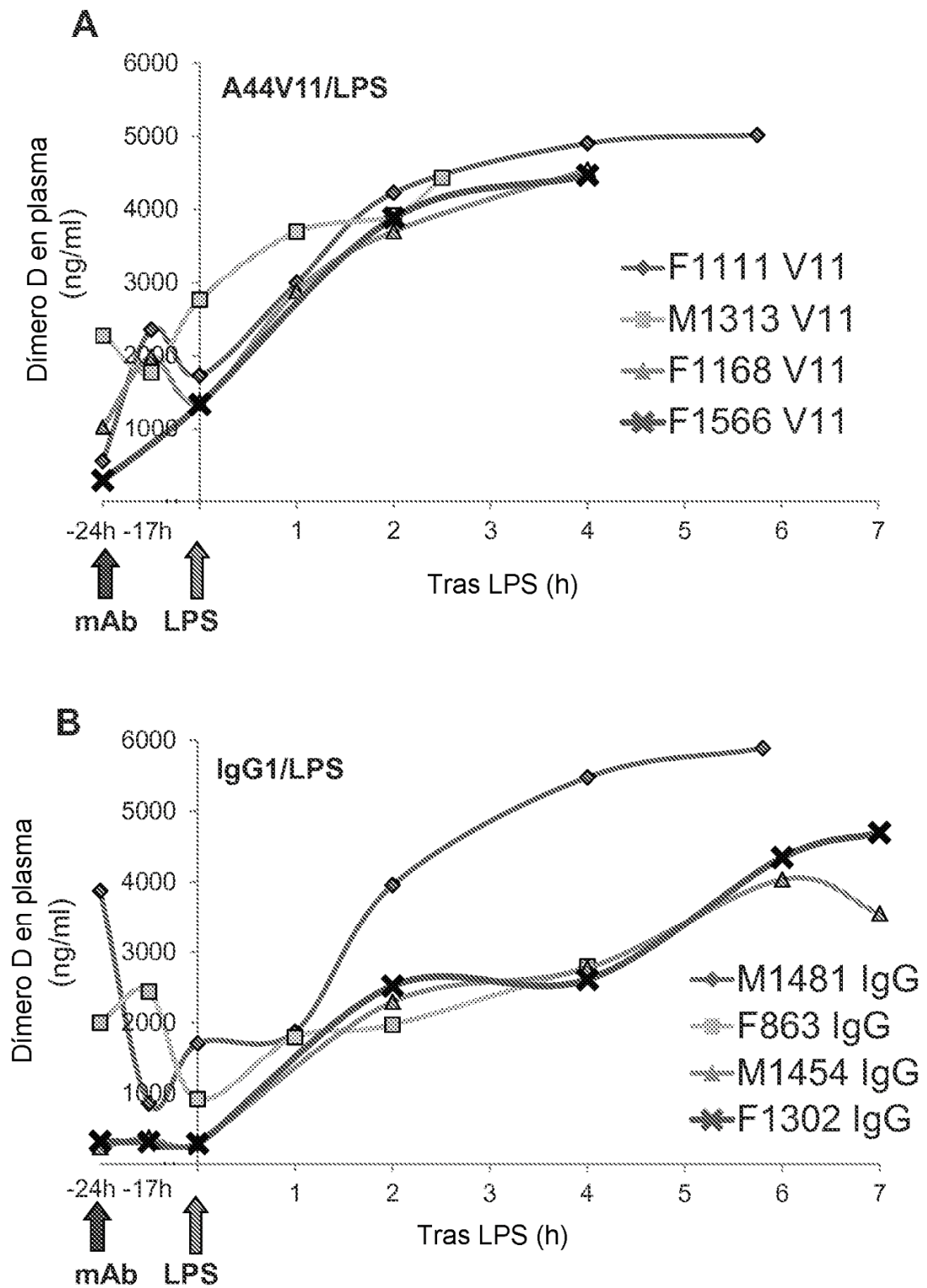
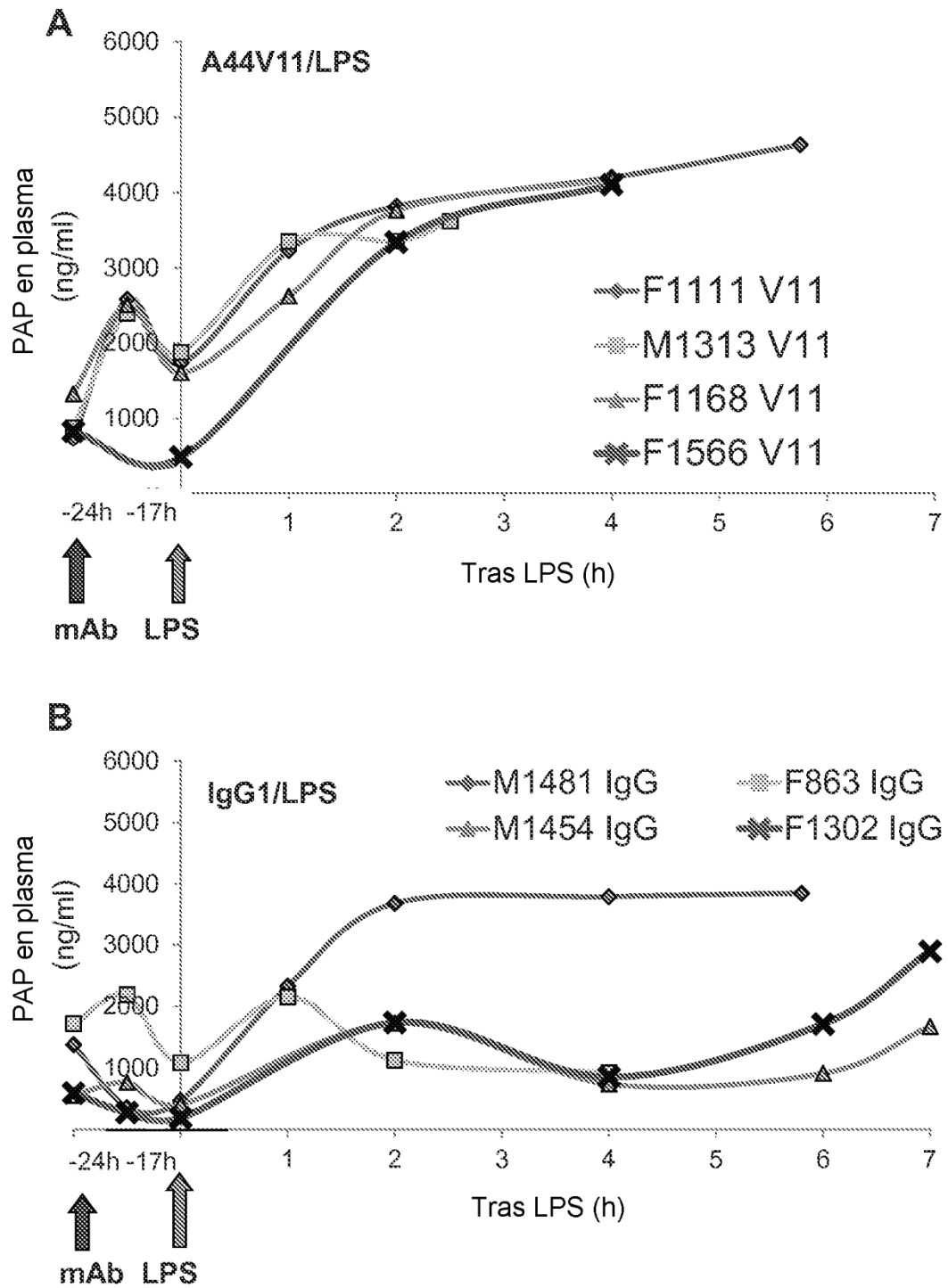


FIG. 33



**FIG. 34**



**FIG. 35**

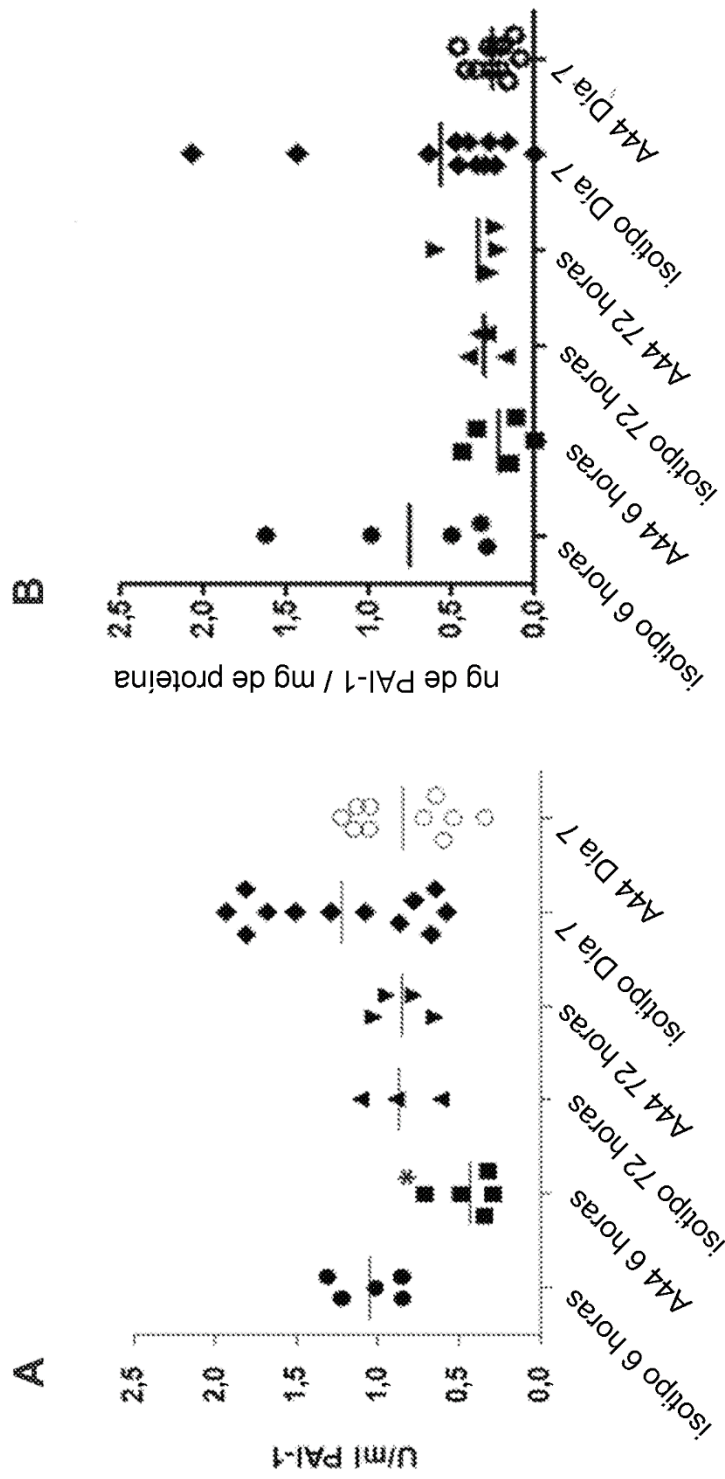


FIG. 36

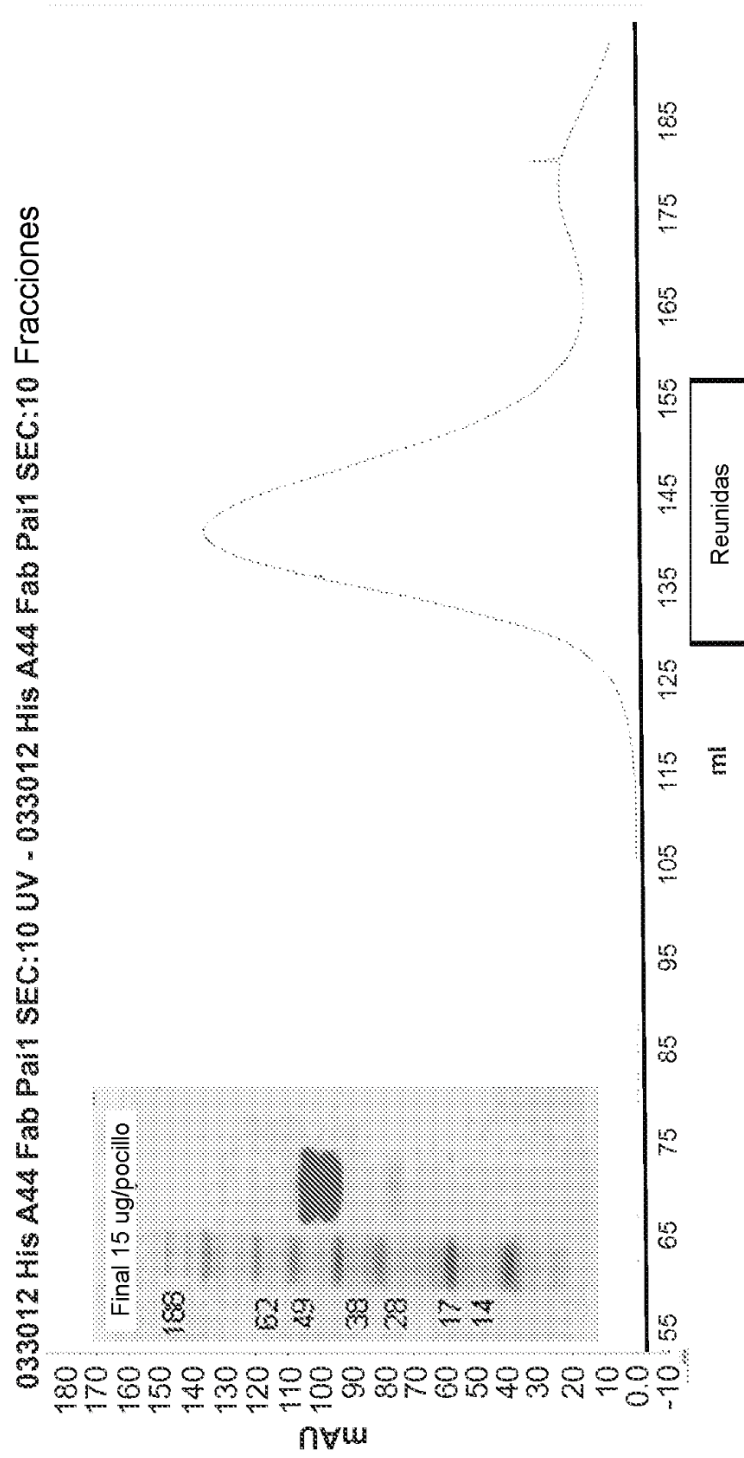


FIG. 37

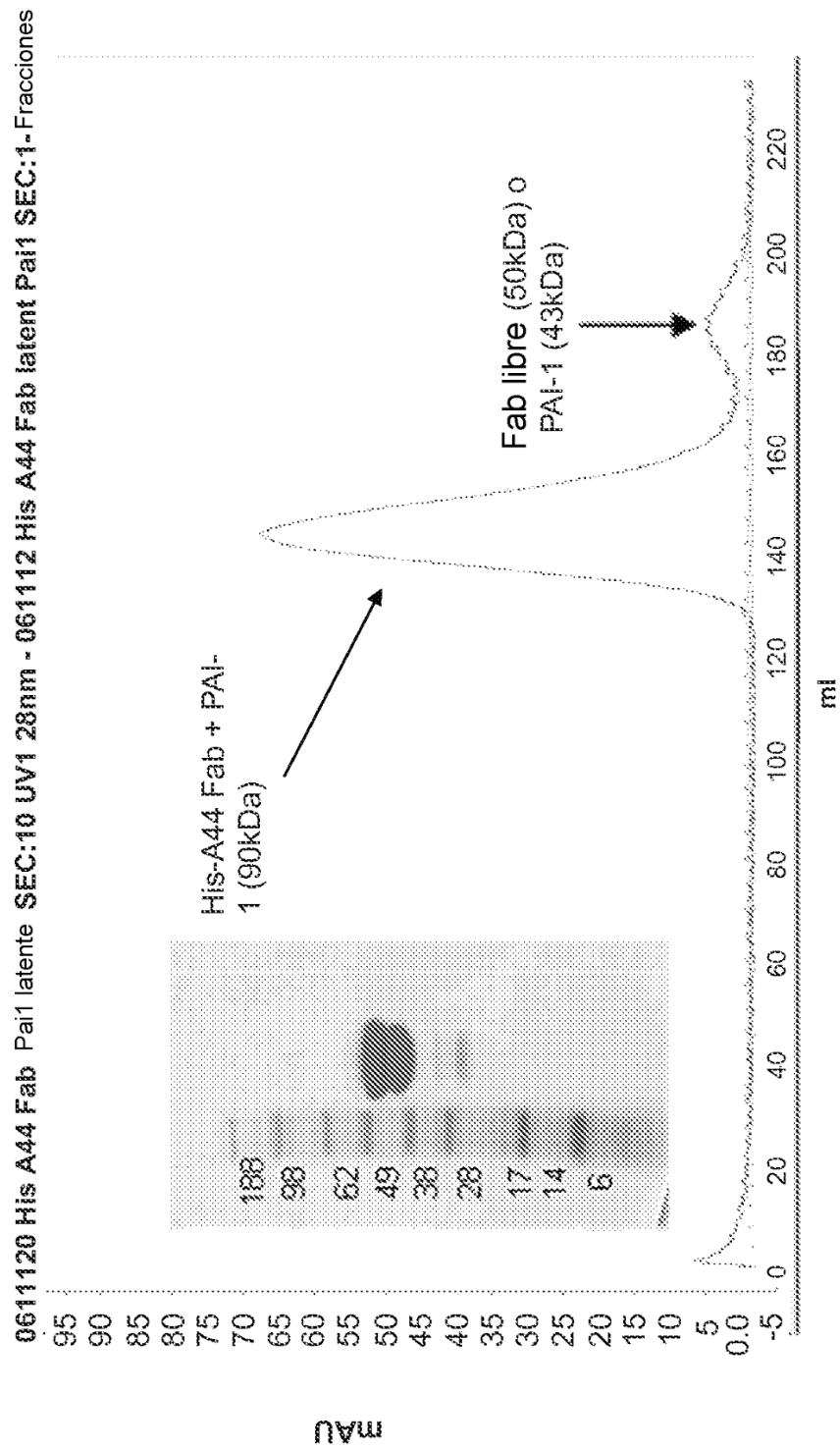
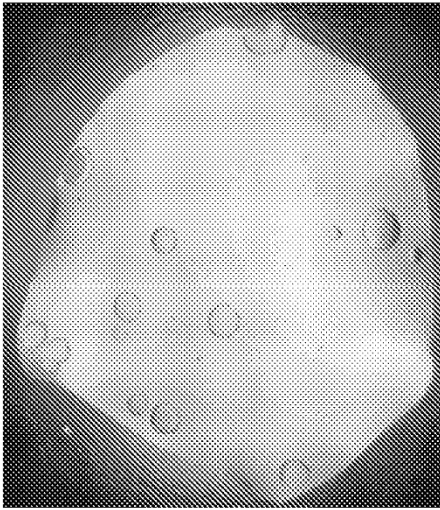


FIG. 38



A



B

FIG. 39

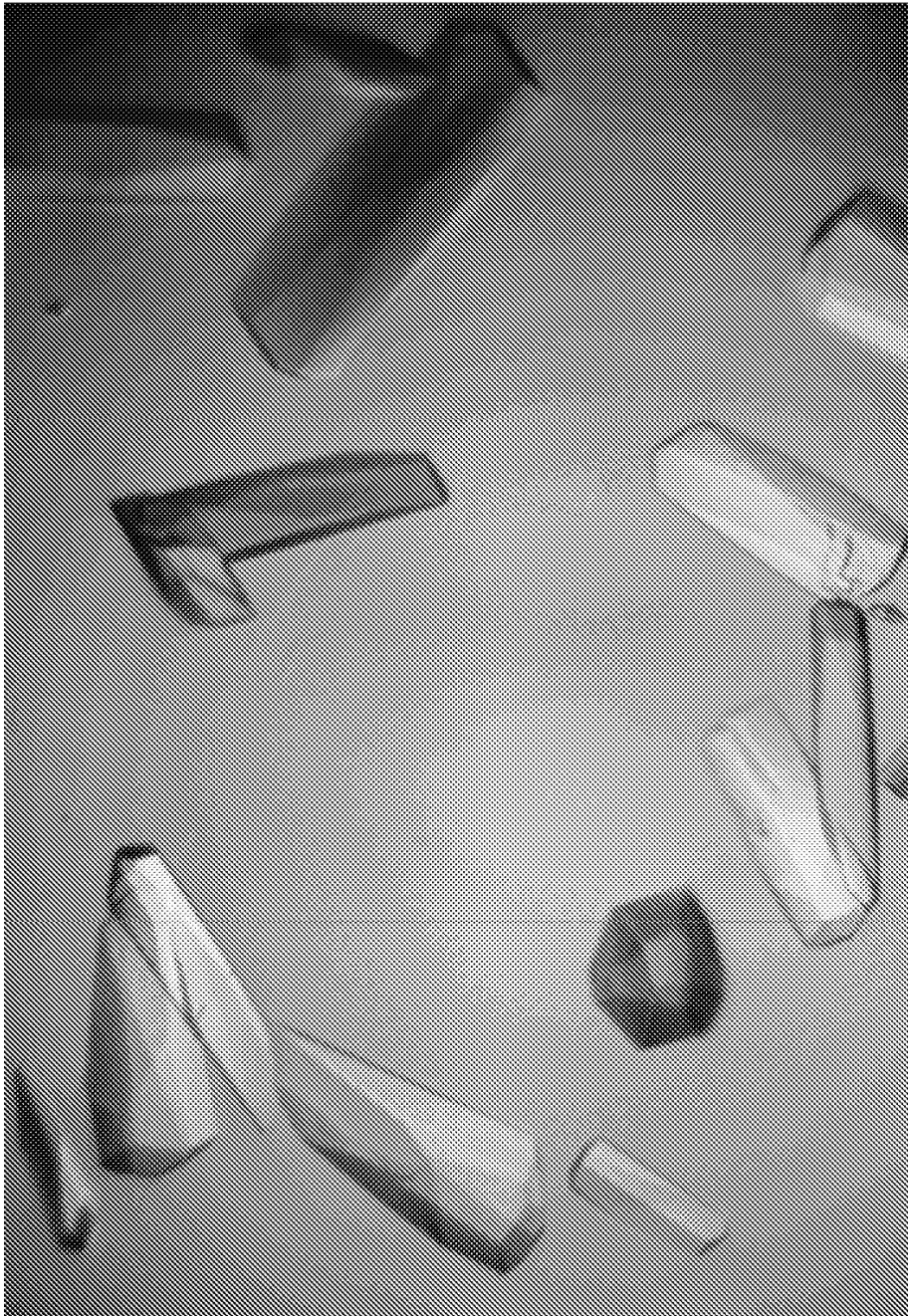
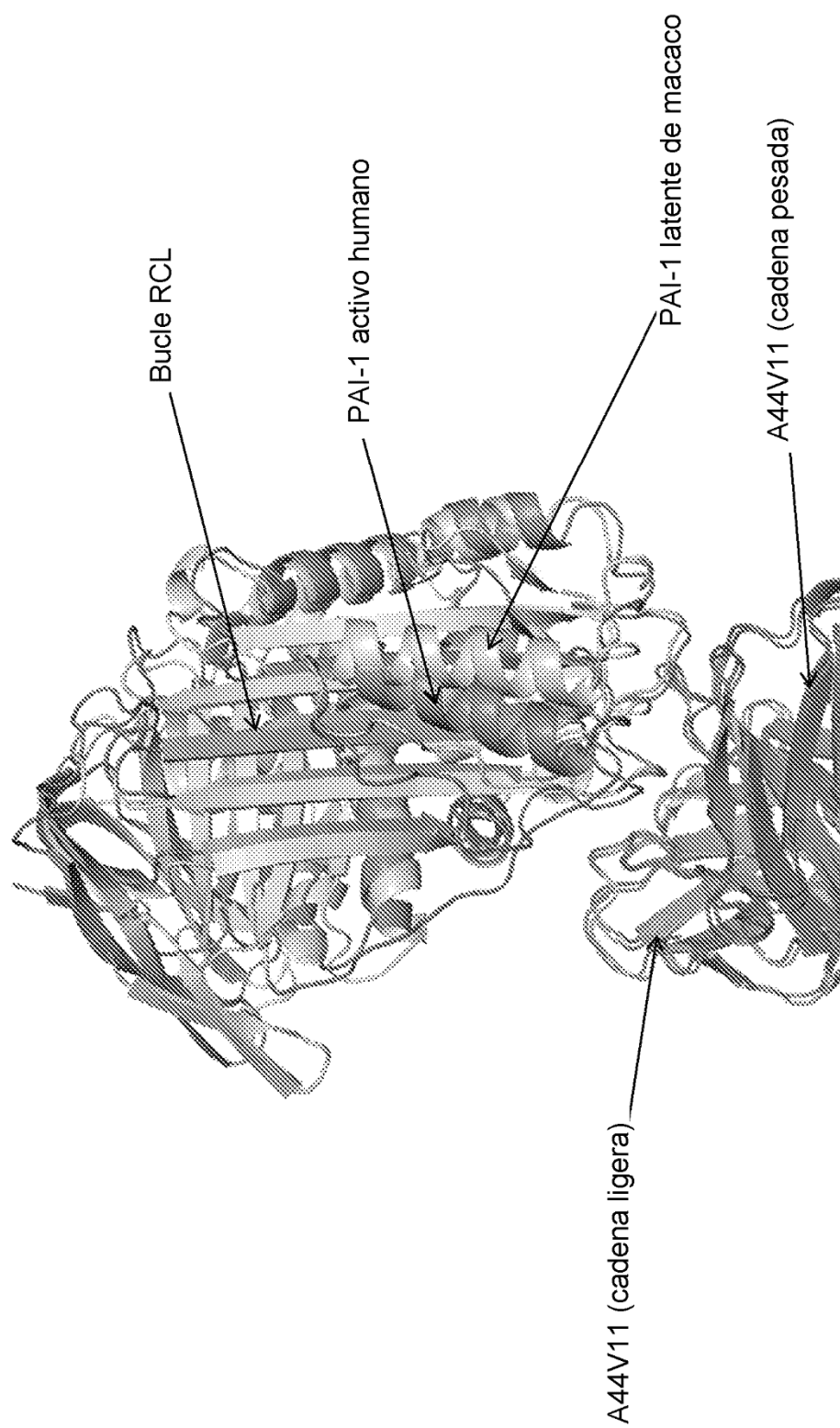
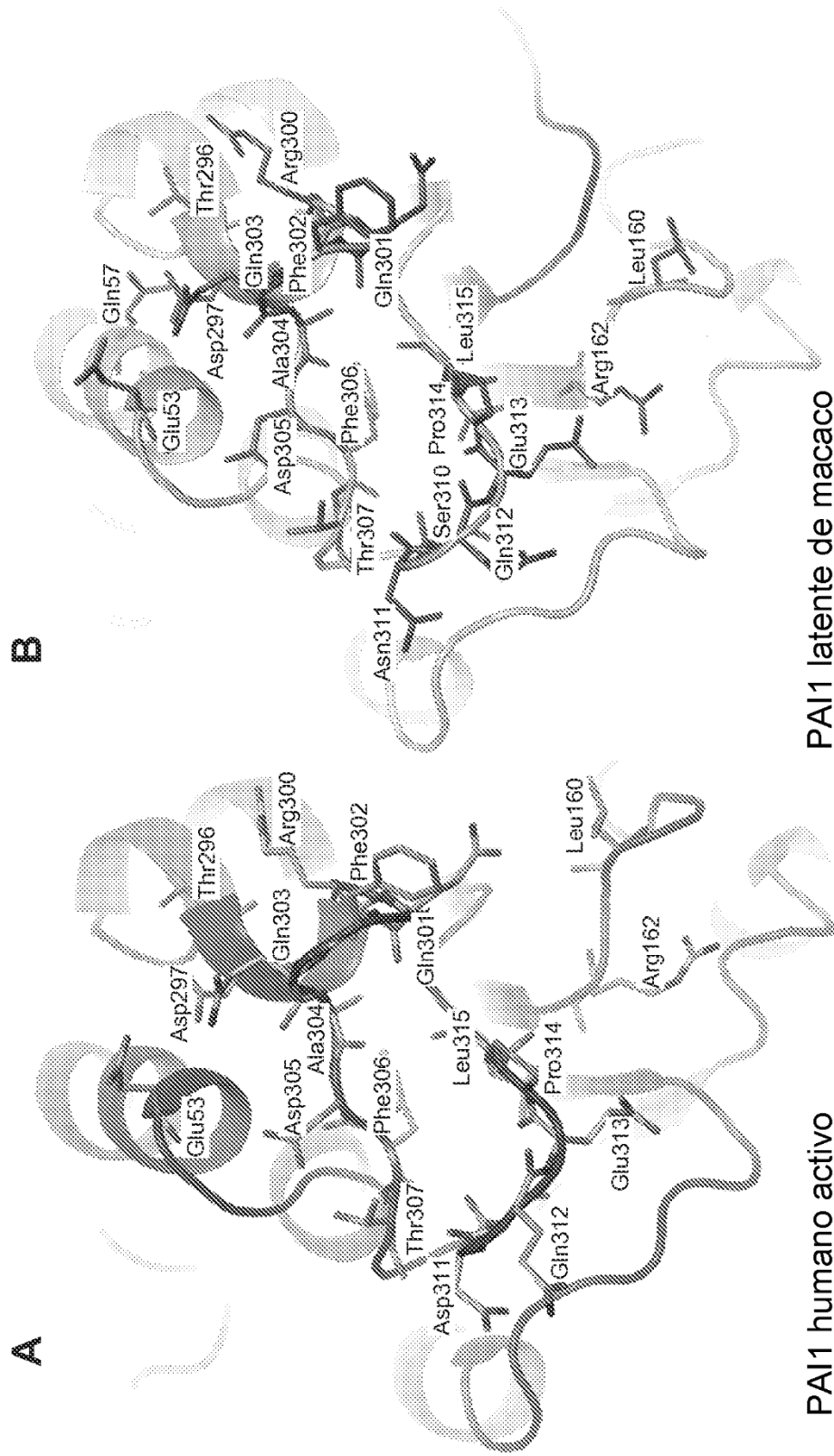


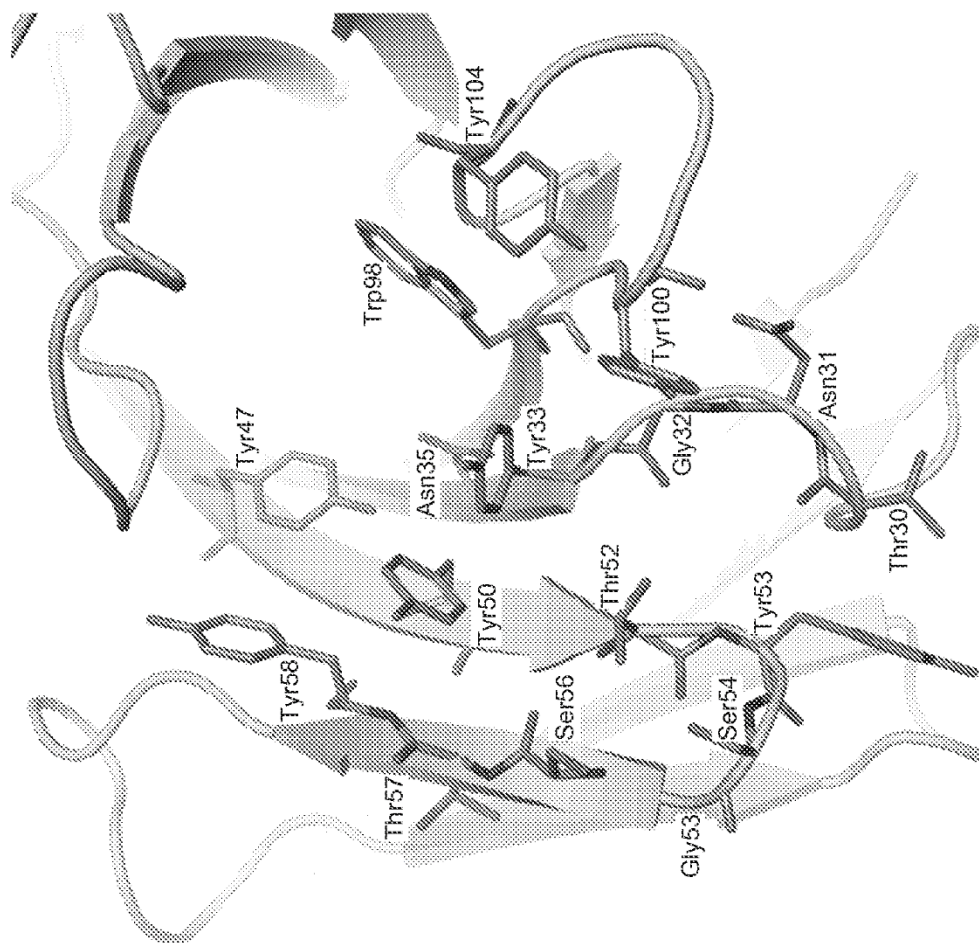
FIG. 40



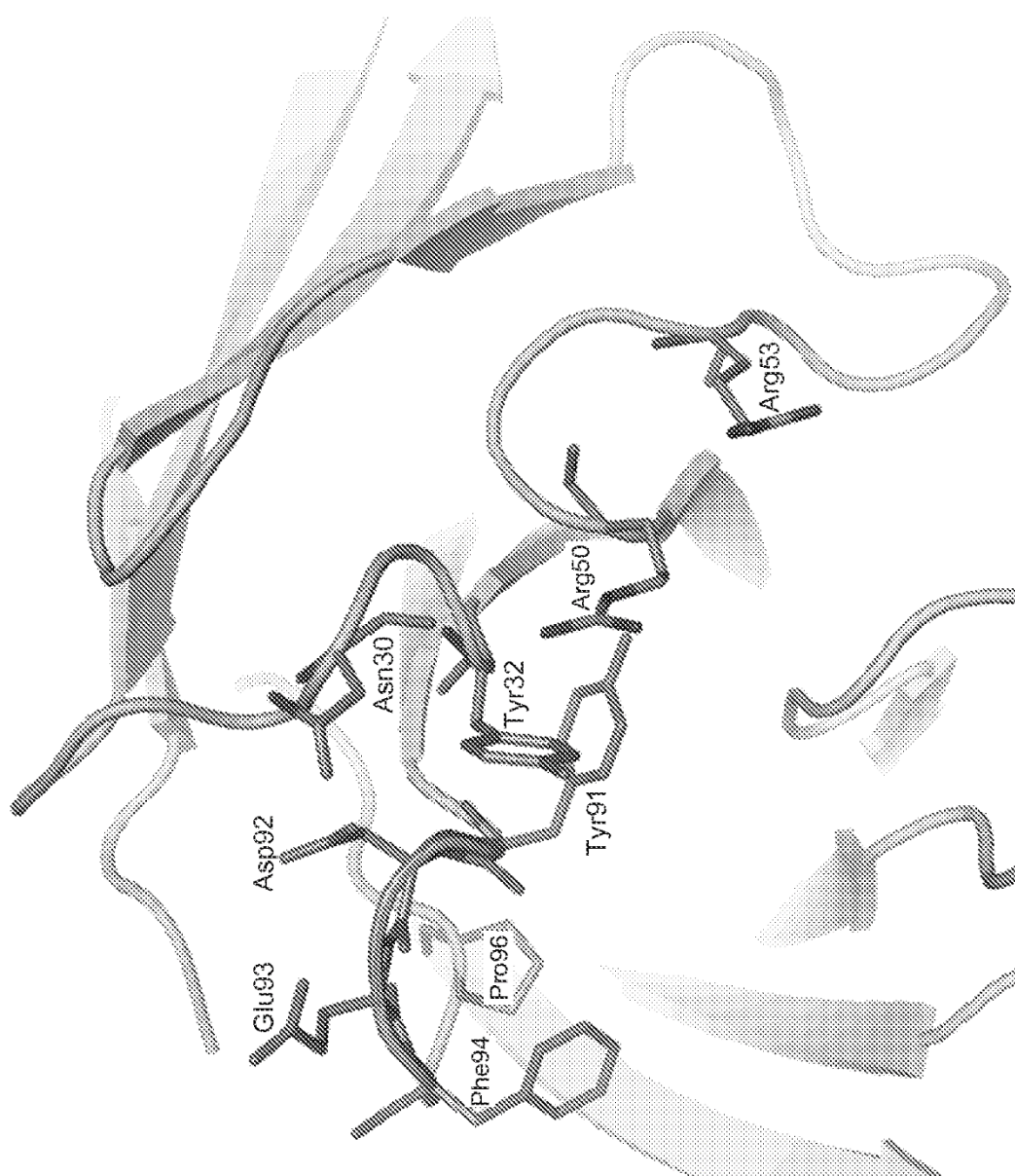
**FIG. 41**



**FIG. 42**



**FIG. 43**



**FIG. 44**

PAI-1 macaco	TTGGETTRQQIQQ
PAI-1 humano	TTGGETTRQQIQQ
PAI-1 rata	TTAGKTRQQIQQ
PAI-1 ratón	TTAGKTRQQIQQ
PAI-1 macaco	GAVDQLTRLVLVNA
PAI-1 humano	GAVDQLTRLVLVNA
PAI-1 rata	GAVNHLTRLVLVNA
PAI-1 ratón	GAVDELTRLVLVNA
PAI-1 macaco	PLENLGMFDMERQFQADFTSLSNQEEPLHVAQALQKVKE
PAI-1 humano	PLENLGMFDMERQFQADFTSLSDQEEPLHVALALQKVKE
PAI-1 rata	PLEKLGMTDIFSS <del>TQADFTSLSDQEQQLS</del> VAAQALQKVKE
PAI-1 ratón	PLEKLGMPDMFSATLADFTSLSDQEQQLSVAQALQKVRIE

FIG. 45

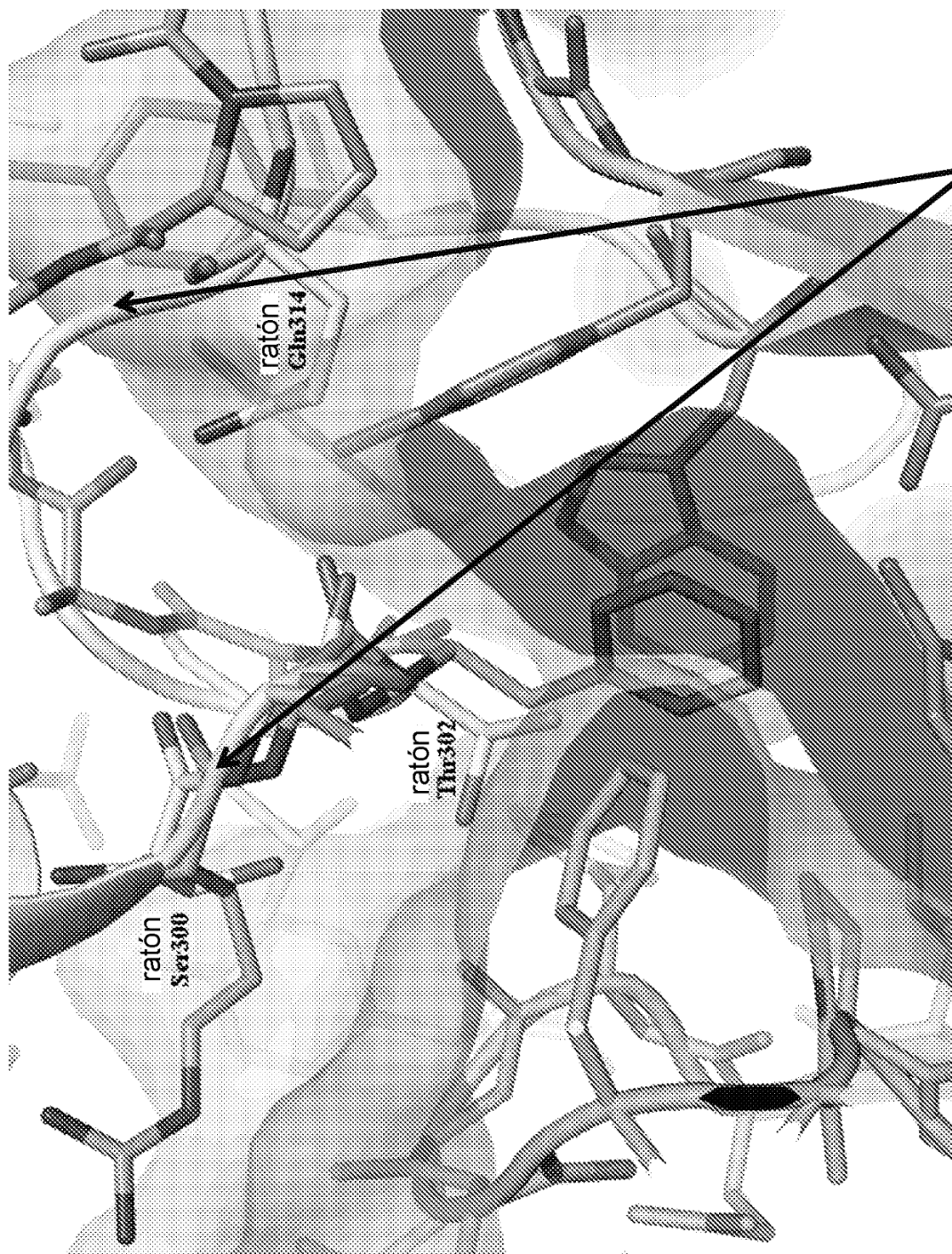
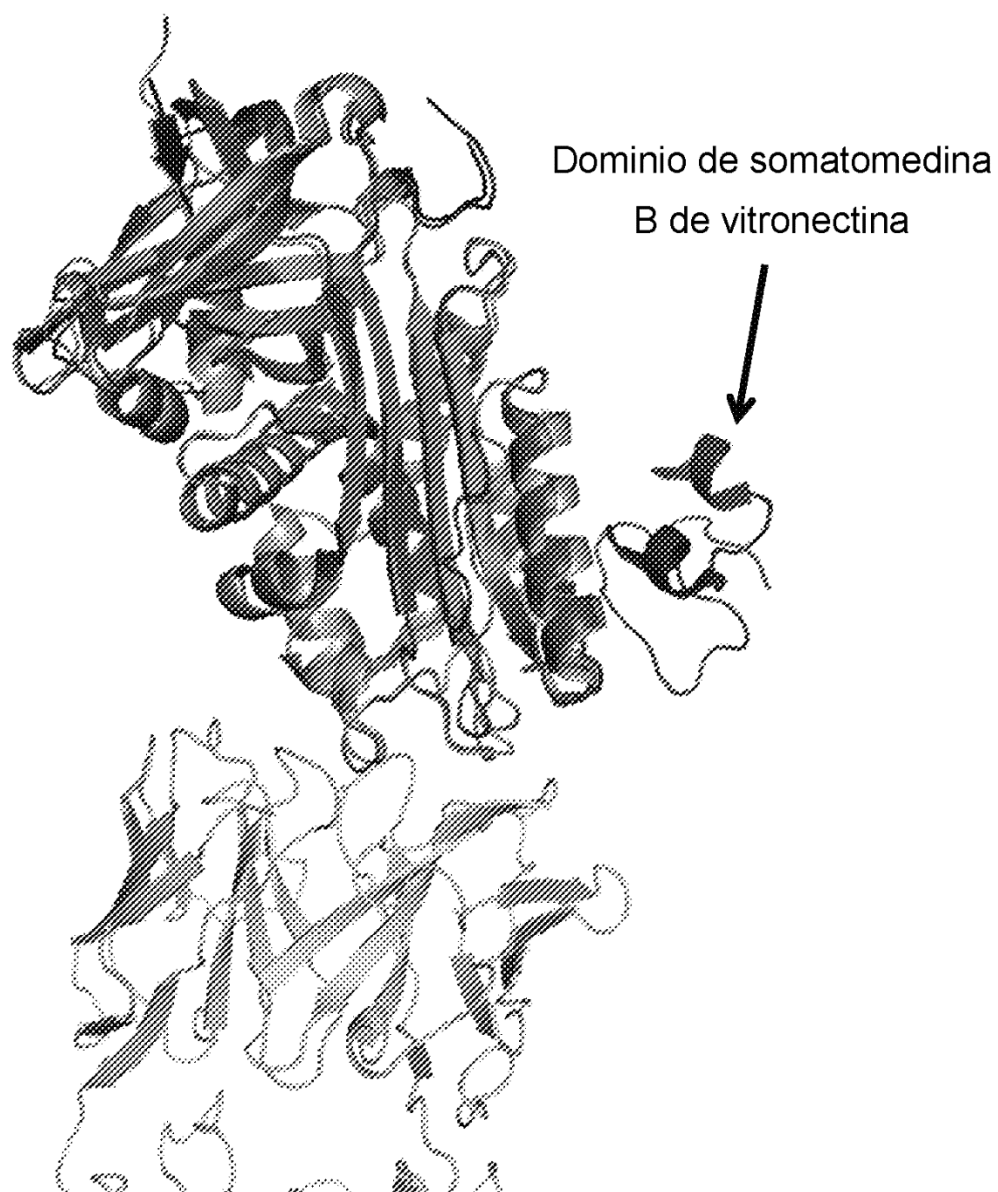
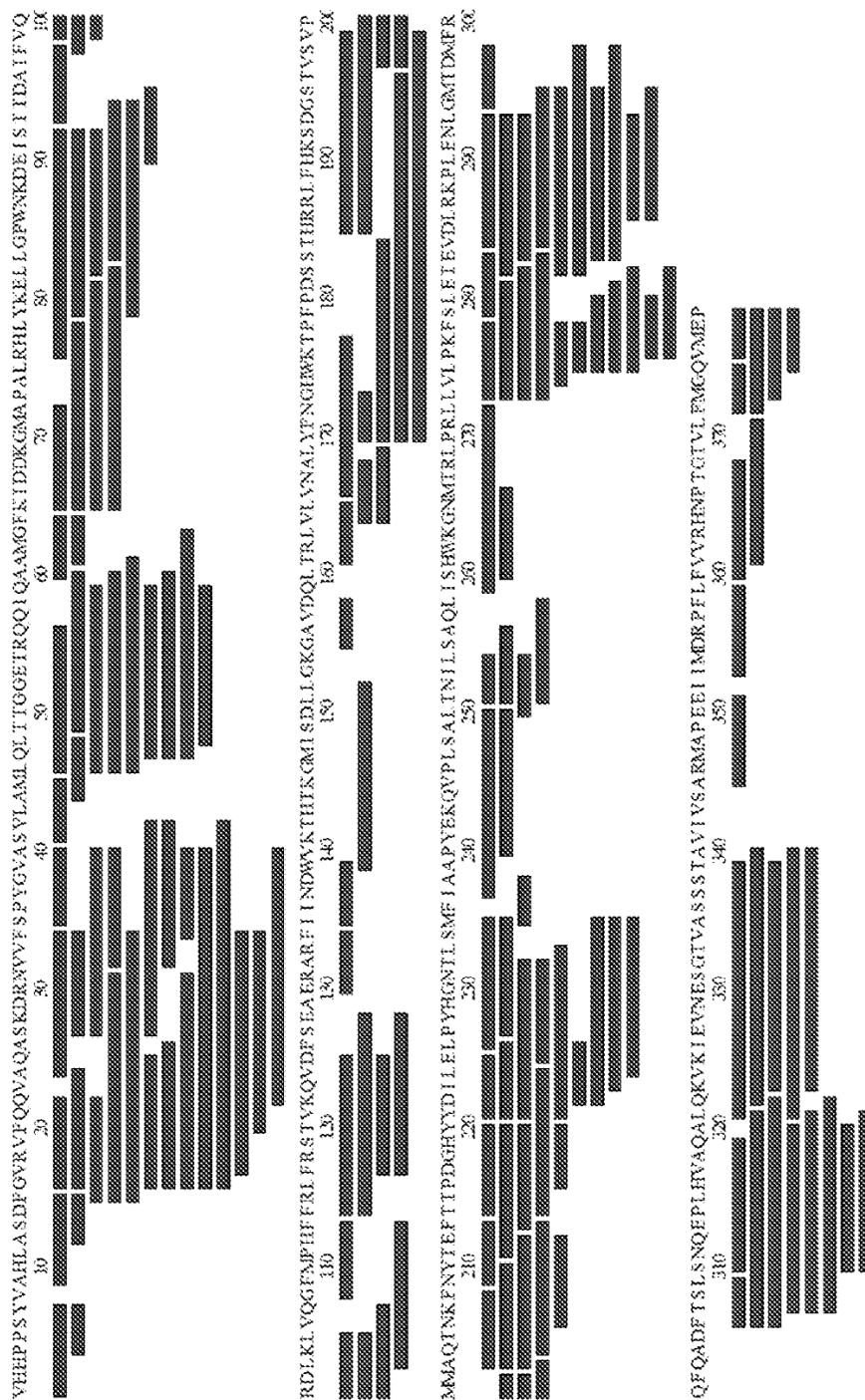


FIG. 46



**FIG. 47**



Total : Cobertura 95,3%  
 Redundancia 4,44

FIG. 48

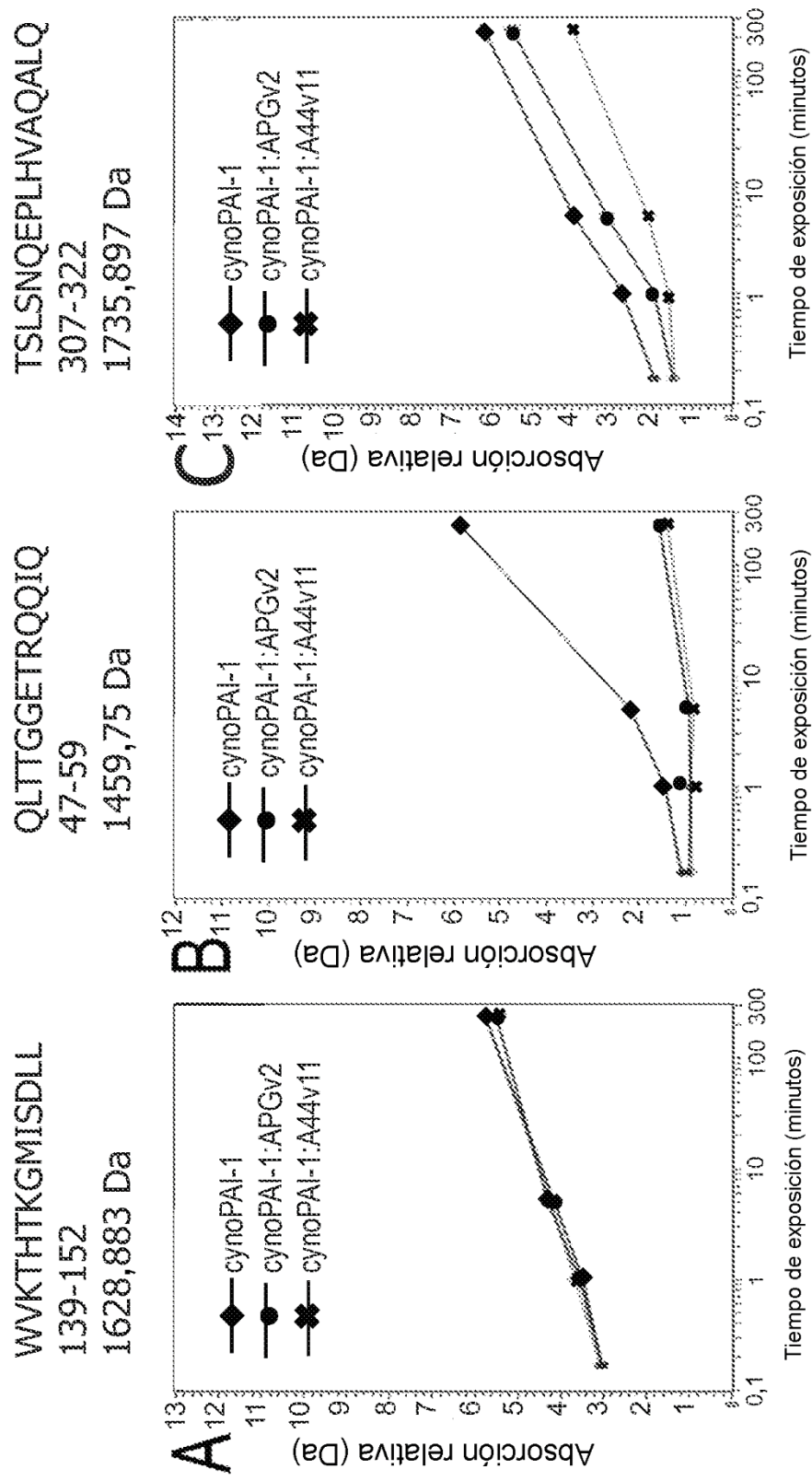
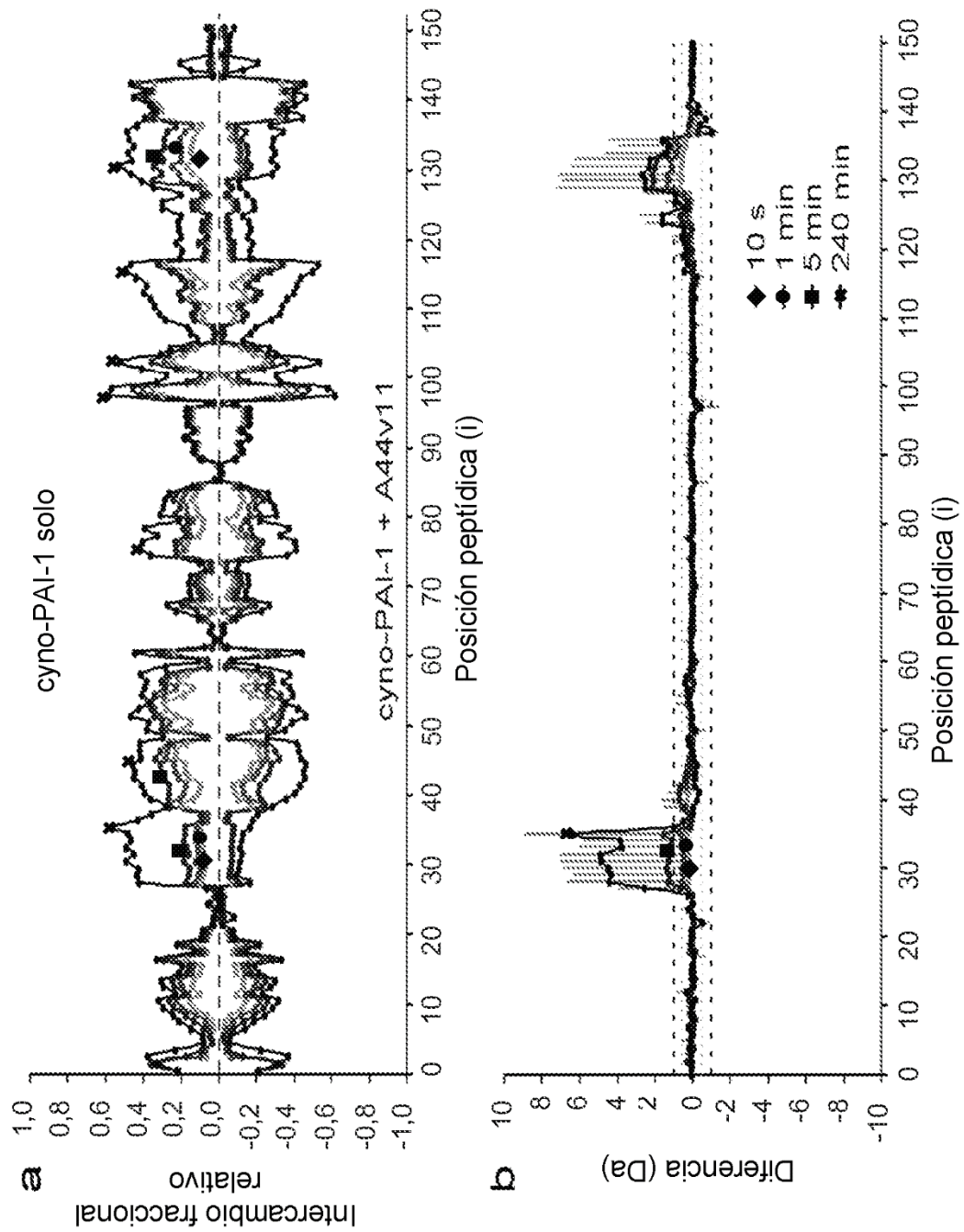
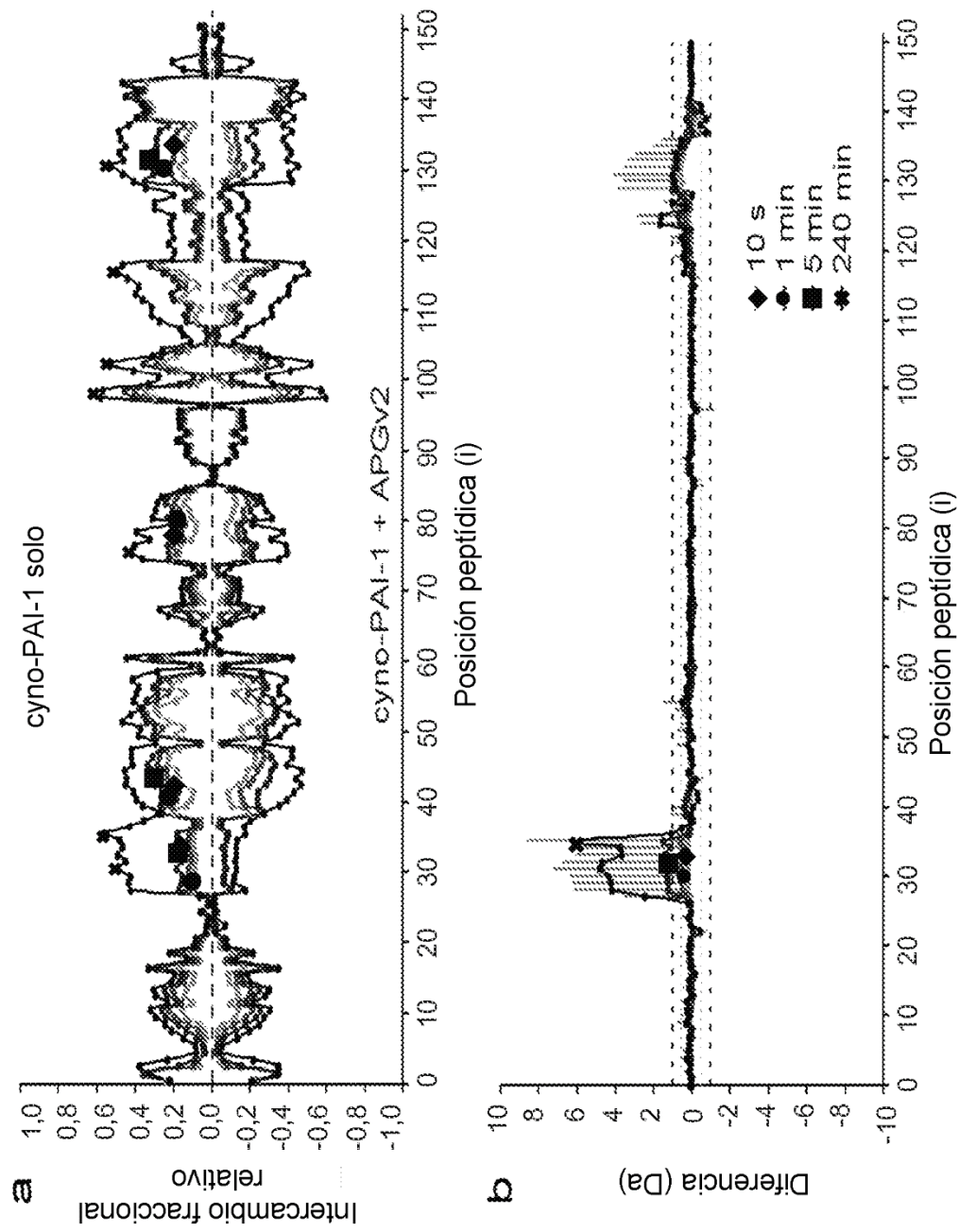


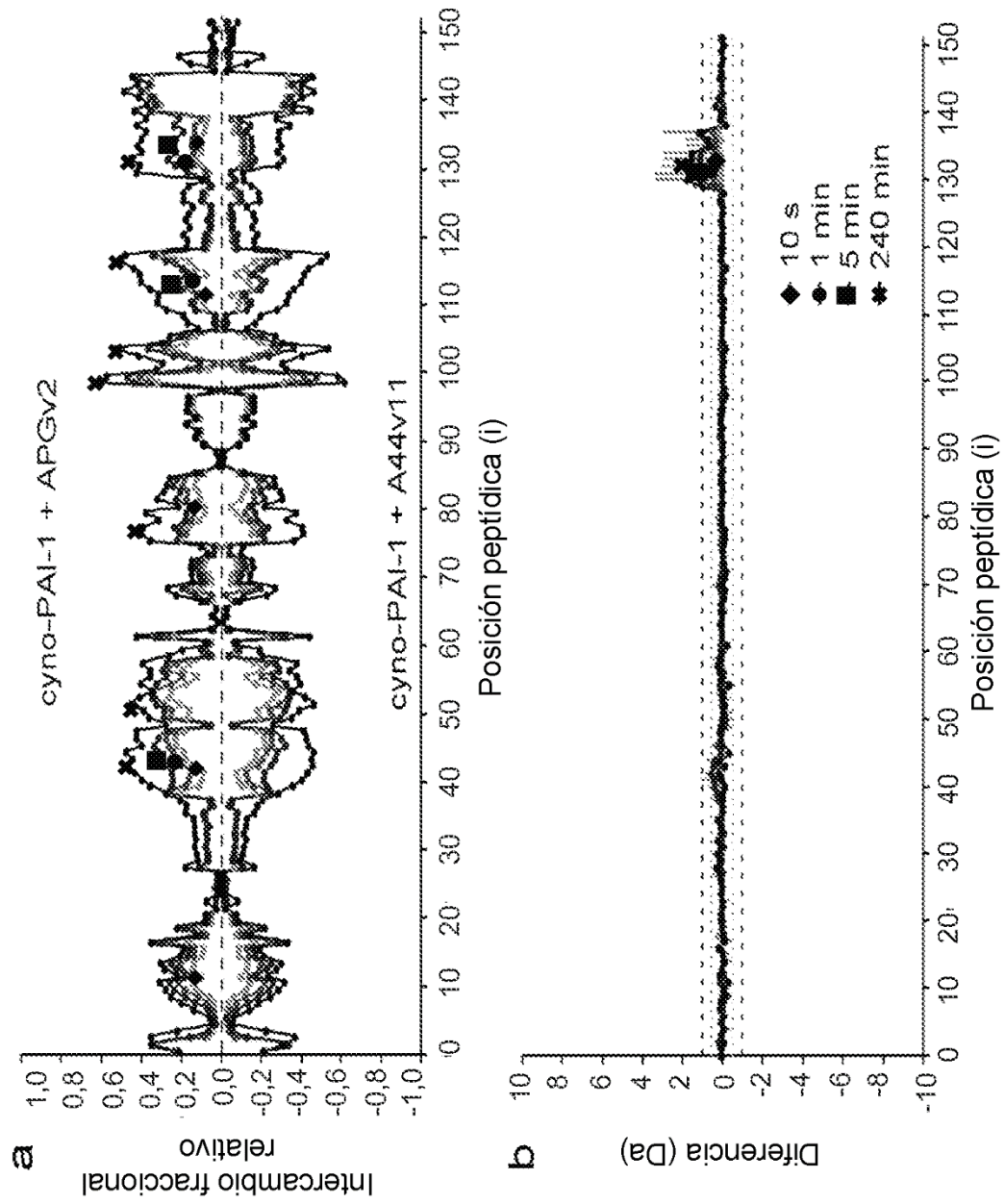
FIG. 49



**FIG. 50**



**FIG. 51**



**FIG. 52**

VHHPPSYVAH LASDFGVRVF QQVAQASKDR NVVFSYPYGA SVLAMLQLLT  
**GGETRRQQLQA** AMCFKIDDKG MAPALRHLYK ELLGPWNKDE ISTTDAIFVQ  
 RDLKLVQGF M PHEFRLERST VKQVDFSEAE RARFIINDWV KTHTKGMISD  
 LLGKGAVDQL **TR**LVLVNALLY FNGHWKTPFP DSSTHRRLFH KSDGSTVSV  
 MMAQTNKFN Y TEFTTPDGHY YDILELPYHG NTLSMFIAAP YEKQVPLSAL  
 TNILSAQLIS HWKGNMTRL P RLLVLPKFSL ETEVDLRKPL ENLGM**TD****MR**  
**QFQADFTSLS** **NOEPL**HVAQA LQVKKIEVNE SGTVASSSTA VIVSARMAPE  
 EIIMDRPELF VVRHNPTGT V LFMGQVMEP

NEGRITA ≡ epítipo mediante HX MS


 ≡ epítipo mediante rayos X

FIG. 53