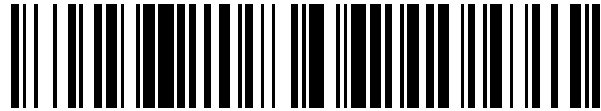


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 963**

51 Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2008 E 08852770 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2222707**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-factor XI y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

21.11.2007 US 989523 P

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

18.04.2016

73 Titular/es:

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY
(50.0%)
3181 SW Sam Jackson Park Road
Portland, OR 97239, US y
VANDERBILT UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GRUBER, ANDRAS;
TUCKER, ERIK IAN;
HANSON, STEPHEN RAYMOND y
GAILANI, DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 566 963 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 monoclonales anti-factor XI y métodos de uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos capaces de unirse al factor XI y a métodos de uso de los mismos, en particular a métodos de uso como agentes antitrombóticos que no comprometen la hemostasia.

10 **Antecedentes de la invención**

La hemostasia es una función vital que detiene la hemorragia y protege la integridad de la circulación sanguínea a niveles tanto moleculares como macroscópicos. La hemostasia incluye una cascada de coagulación de enzimas secuencialmente activables que tradicionalmente se divide en tres partes: 1) una vía intrínseca, que incluye interacciones de las proteínas de la coagulación de la sangre que conducen a la generación del factor de coagulación IXa sin la participación del factor de coagulación VIIa; 2) una vía extrínseca, que incluye interacciones de las proteínas de coagulación de la sangre que conducen a la generación de factor de coagulación Xa y/o IXa sin la participación del antecedente de tromboplastina (factor XI); y 3) una vía de coagulación común, que incluye interacciones de las proteínas de la coagulación de la sangre II, V, VIII, IX y X que conducen a la generación de trombina (factor IIa). La trombina activa las plaquetas y genera fibrina, ambos de los cuales son elementos componentes esenciales del tapón hemostático que es responsable de sellar la brecha vascular. La ausencia completa de trombina o de plaquetas causa parálisis de la hemostasia y conduce a una hemorragia letal.

La trombosis, como la hemostasia, es un proceso dependiente de plaquetas y de trombina. La trombosis es una deposición patológica intravascular dependiente de trombina y progresiva de fibrina polimerizada y plaquetas activadas que provoca la oclusión de los vasos sanguíneos en diversos órganos. En los mamíferos sanos, la coagulación intravascular se localiza en el sitio de la hemostasia. La progresión intraluminal en la trombosis se bloquea eficientemente mediante la acción de enzimas e inhibidores antitrombóticos naturales, tales como la proteína C activada, la plasmina y la antitrombina. La trombosis se desarrolla cuando el sistema antitrombótico falla en el control adicional de la generación de trombina intravascular. La causalidad de la trombosis macrovascular y/o microvascular en la morbilidad y la mortalidad se ha documentado directamente en varias enfermedades que incluyen trombosis venosa profunda, tromboembolia pulmonar, trombosis arterial periférica y embolia, trombosis venosa de la retina, así como infarto de miocardio (Meadows (1965) *Med. J. Aust.* 4:409–411; Harland (1966) *Lancet* 26:1158–1160), ictus isquémico (Carmon (1966) *J. Neurol. Sci.* 4:111–119), septicemia por ántrax y septicemia meningocócica (Dalldorf (1977) *Arch. Pathol. Lab. Mead.* 101:6–9), o trombocitopenia inducida por heparina (Rhodes (1973) *Surg. Gynecol. Obstet.* 136:409–416). La evidencia de daños orgánicos de la oclusión trombótica y el origen hipóxico también está disponible en otros grupos de enfermedades, tales como las fiebres hemorrágicas (Dennis (1969) *Br. J. Haematol.* 17:455–462; Gear (1979) *Rev. Infect. Dis.* 1:571–591; Ignatiev (2000) *Immunol Lett.* 71:131–140), la angiopatía diabética (Ishibashi (1981) *Diabetes* 30:601–606; Boeri (2001) *Diabetes* 50:1432–1439), la enfermedad renal (Miller (1980) *Kidney Int.* 18:472–479; McCutcheon (1993) *Lupus* 2:99–103), y otras diversas afecciones.

Aunque la trombosis y la hemostasia no son procesos moleculares idénticos, son lo suficientemente similares como para que los fármacos antitrombóticos desarrollados hasta la fecha estén dirigidos a ambos. La trombosis se trata con agentes antiagregantes plaquetarios, profibrinolíticos y anticoagulantes, aunque la mayoría de estos agentes pueden bloquear por completo la trombosis y la hemostasia cuando se administra a sus dosis máximas eficaces. Los fármacos antitrombóticos están dirigidos a los bloques componentes de los trombos (fibrina y plaquetas) o inhiben la participación de moléculas (factores de coagulación) y células (plaquetas) en el proceso de formación de los trombos. Entre los médicos e investigadores está ampliamente extendido que si un agente antitrombótico es incapaz de bloquear la hemostasia no funcionará en la trombosis.

Uno de los agentes antitrombóticos anticoagulantes más antiguos, la heparina, sigue siendo la inyección más administrada en el mundo. Dosis de heparina lo suficientemente altas pueden alcanzar casi el 100 % de eficacia, pero solo a costa de paralizar la hemostasia a tales dosis. Por desgracia, los agentes antitrombóticos más nuevos, como las heparinas fraccionadas o los agentes inhibidores directos de la trombina no funcionan mucho mejor. Como resultado, los agentes antitrombóticos, especialmente los anticoagulantes y los agentes profibrinolíticos, se deben administrar a dosis inferiores a sus dosis máximas eficaces, y la trombosis sigue siendo una enfermedad que no está bien tratada. La introducción de nuevos compuestos que se basan en la promesa de una mayor eficacia, pero que no pueden prometer mejorar la seguridad hemostática es injustificable. Hasta la fecha, los compuestos antitrombóticos no han estado a la altura de la promesa de mejora de la seguridad. El agente antitrombótico ideal produciría la anticoagulación de la sangre sin afectar de forma adversa a la hemostasia.

El documento US2006/057140 (Feuerstein G Z) da a conocer anticuerpos monoclonales contra el FXI y enseña el uso de tales anticuerpos en el tratamiento de la trombosis. SUN ET AL. 1996 divulgan anticuerpos monoclonales contra el FXI designados 2A12 y 11AE, que están dirigidos contra epítomos en el dominio A3 de la cadena pesada del FXI. Estos anticuerpos son potentes inhibidores de la activación del FIX por el FISA.

TUCKER ET AL. 2009 (publicado previamente online el 22 de octubre de 2008) describe la producción del anticuerpo anti-FXI denominado 1A6.1.1, sin indicar el epítipo ni la secuencia del anticuerpo.

5 Por lo tanto, sigue existiendo una apremiante necesidad médica para el desarrollo de agentes seguros pero eficaces que bloqueen la generación de trombina intravascular sin paralizar la hemostasia.

Breve resumen de la invención

10 Se proporcionan composiciones y métodos para la inhibición de la trombosis sin comprometer la hemostasis. Las composiciones incluyen anticuerpos monoclonales anti-factor XI (aXIMab) capaces de unirse a un epítipo en la cadena pesada del FXI humano, en particular el dominio A3 de la cadena pesada del FXI humano. Las composiciones también incluyen fragmentos de unión a epítipo, variantes, y derivados de los anticuerpos monoclonales, líneas celulares que producen estas composiciones de anticuerpos, y moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. La invención incluye además
 15 composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a epítipo, variantes, o derivados de los mismos, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto que las necesiten con el fin de inhibir la trombosis, reducir una dosis necesaria de un agente antitrombótico en el tratamiento de la trombosis, tratar el cáncer metastásico, o tratar una reacción
 20 inflamatoria aguda. También se proporcionan métodos para fabricar un anticuerpo monoclonal anti-factor XI, o fragmentos de unión a epítipo, variantes, o derivados de los mismos. La invención es como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1. Modelo de obtención de muestras locales y dispositivo trombogénico utilizado para iniciar la formación de trombos. (A) Esquema cualitativo del método de obtención de muestras locales (no a escala). B) Imagen de microscopio electrónico de barrido de material de injerto vascular clínico sin recubrir y recubierto de colágeno con politetrafluoroetileno expandido (ePTFE).

30 Figura 2. Inhibición de la actividad procoagulante del FXI después de la administración de un anticuerpo monoclonal anti-FXI (aXIMab). Sea administró a 4 babuinos distintos un solo bolo i.v. (2 mg/kg) de aXIMab en 5 minutos. Las muestras de plasma se recogieron en 1/10^o en v/v de anticoagulante de citrato al 3,2 % y se analizaron en un ensayo de coagulación de una etapa para evaluar la inhibición del FXI. Cada punto de tiempo representa la media de 2-4 animales por separado, cada uno superando una inhibición del 95 % hasta el día 8.
 35 Todos los tiempos de coagulación se habían normalizado el día 11.

Figura 3. La inhibición del FXI reduce la deposición de plaquetas y de fibrina en los injertos vasculares recubiertos de colágeno. Efectos de la inhibición del FXI sobre la deposición de (A) plaquetas y (B) fibrina sobre injertos vasculares recubiertos con colágeno (4 mm de diámetro interno). Los injertos trombogénico se colocaron en animales no tratados (n = 8) o tratados con aXIMab (n = 6) (inhibición del FXI > 95 %). Se dejó que la sangre fluyera a través de los dispositivos a una velocidad de pinzado de 100 ml/min, de modo que se produce una velocidad media de cizallamiento de 265 s⁻¹. Los niveles de significación son ***P = 0,001. Los valores son las medias ± SEM.

40 Figura 4. La inhibición del FXI por aXIMab reduce la generación de trombina y la activación de plaquetas, mientras que no afecta a la fibrinólisis. Niveles locales (A, C) y sistémicos (B, D) de trombina/antitrombina (TAT) y β-tromboglobulina (β-TG) durante la formación de trombos, respectivamente. Las muestras de sangre también se analizaron para el producto de la fibrinólisis el dímero D (E). Los valores locales son los tomados de la pared cercana, la capa de límite del flujo bajo 1 cm distal del trombo en crecimiento en el transcurso de 10 minutos antes de su tiempo designado, mientras que las muestras sistémicas se tomaron de la derivación arterio/venosa proximal al dispositivo trombogénico. Los puntos de tiempo de cero en todos los grupos proceden de las muestras tomadas por vía sistémica inmediatamente antes de cada estudio. La inhibición del FXI reduce drásticamente la formación de trombina local y la activación de las plaquetas, lo que se tradujo en reducciones sistémicas significativas de TAT y de β-TG en comparación con los controles de colágeno a los 60 minutos. No se detectó fibrinólisis significativa ni en los animales no tratados ni en los tratados con aXIMab.

45 Figura 5. La inhibición del FXI limita la estabilidad del trombo y evita la oclusión del injerto vascular en condiciones de cizalladura arterial alta. Se muestran los efectos de la inhibición del FXI y AAS sobre la deposición de plaquetas sobre injertos vasculares recubiertos con colágeno (2 mm de d.i.). Los segmentos de injerto vascular recubiertos con colágeno se colocaron en derivaciones arterio-venosas permanentes en animales no tratados (n = 9), tratados con AAS (n = 6), y tratados con aXIMab (n = 5). Se dejó fluir la sangre a través de los injertos a una velocidad de 100 ml/min, de modo que se produjo una velocidad de cizalladura inicial media en la pared de 2120 s⁻¹. El flujo se mantuvo por la presión arterial pulsátil hasta que el injerto se ocluyó (definido como ≤ 20 ml/min de velocidad de flujo). Los trombos que se formó en los injertos en los animales tratados con aXIMab eran inestables y no ocluyeron los injertos durante los estudios de 60 minutos de largo. Los niveles de significación son *P = 0,05, **P < 0,01 en comparación con los controles sin tratamiento, utilizando la prueba del orden logarítmico con los dispositivos no ocluidos censurados. Los valores son la media +/- SEM.

60 Figura 6. El tiempo de hemorragia en la plantilla es normal en los babuinos con el FXI inhibido. El tiempo de hemorragia se controló repetidamente en la superficie palmar del antebrazo, antes y durante el tratamiento con

aXIMab o AAS usando un método y un dispositivo aprobado por la FDA (Surgicutt). AAS (n=10) prolonga el tiempo de hemorragia mientras que la inhibición del FXI por aXIMab (n = 18) no afectó de forma demostrable a la hemostasia en comparación con los controles sin tratamiento (n = 14). El promedio de los cambios del tiempo de hemorragia se muestran \pm SEAM. Los niveles de significación son $**P \leq 0,01$.

Figura 7. (A) Unión del anticuerpo monoclonal anti-factor XI 1A6 al factor XI usando transferencias de tipo Western. Las bandas en el panel de la izquierda muestran que el anticuerpo 1A6 reconoce el factor XI en el plasma de primates humanos y no humanos. No se observaron bandas similares para las muestras con depleción del factor XI o deficientes en el mismo (panel derecho). (B) aXIMab impidió la formación de fibrina visible y redujo la acumulación de plaquetas en sangre humana con inhibición o deficiencia del FXII a bajo flujo.

Figura 8. Inhibición de la actividad procoagulante del FXI tras la administración de aXIMab. Se administró a un solo babuino un único bolo intravenoso (2 mg/kg) de aXIMab en 5 minutos. Las muestras de plasma se recogieron en anticoagulante de citrato y se analizó la actividad procoagulante de FXI (A), el antígeno del FXI (FXI: Ag), y (B) los niveles de inhibidor en 4 semanas, siendo cada punto de tiempo la media de mediciones por duplicado. El ELISA de FXI: Ag pudo detectar tanto el FXI tanto libre como en forma de complejo. Dado que el ensayo de Bethesda solo detectó el inhibidor de FXI libre (aXIMab), FXI: Ag y la actividad del FXI a niveles bajos del inhibidor no se correlacionaron hasta que todos los complejos se eliminaron de la circulación. (B) Transferencia de tipo Western de muestras de NHP y NBP de 1 μ l de tamaño fraccionadas mediante 7,5 % de SDS-PAGE no reductora. La detección se realizó con un anticuerpo policlonal contra el FXI humano. Los cinco carriles de la derecha representan las muestras antes de (0) o 1, 6, 8 y 27 días después de la infusión de aXIMab. Abreviaturas: XI – 100 ng de FXI purificado; NHP – plasma humano normal; NBP – plasma de babuino normal; XI-DP – plasma humano deficiente en FXI.

La figura 9 muestra transferencias de tipo Western de la unión del anticuerpo monoclonal anti-factor XI 1A6 XI a las proteínas quiméricas de FXII y precalicreína (PK), que implica la sustitución de dominios del FXI por dominios de PK. Como se muestra en el panel derecho, el anticuerpo monoclonal 1A6 se unió a todas las quimeras FXI/PK excepto a la quimera en la que el dominio A3 de FXI estaba sustituido con un dominio de PK.

La figura 10 muestra transferencias de tipo Western de la unión del anticuerpo monoclonal anti-factor XI 1A6 XI a las proteínas quiméricas de FXI y PK, que implica la sustitución de dominios de PK por dominios del FXI. El anticuerpo monoclonal 1A6 solo se unió a las quimeras en las que se había insertado el dominio A3 de FXI.

La Figura 11 muestra transferencias de tipo Western de la unión del anticuerpo monoclonal anti-factor XI 1A6 a las proteínas de FXI recombinantes que implican mutaciones de diferentes aminoácidos dentro del dominio A3. Aunque un anticuerpo policlonal anti-factor XI unido a todos los mutantes del dominio A3 de FXI, el anticuerpo monoclonal 1A6 no se unió a algunos mutantes en los que los aminoácidos dentro del dominio A3 estaban sustituidos por alanina.

La figura 12 muestra la posición de las sustituciones de alanina en el dominio A3 del FXI que impidió o redujo la unión del anticuerpo monoclonal 1A6 a FXII.

Figura 13. (A) Secuencias de nucléótidos (SEQ ID NO: 2) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la cadena pesada de Aximab. (B) Secuencias de nucléótidos (SEQ ID NO: 4) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de la cadena ligera de Aximab. (C) Secuencias de nucléótidos (SEQ ID NO: 6) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de la cadena pesada de Aximab con injerto de CDR. (D) Secuencias de nucléótidos (SEQ ID NO: 8) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de la cadena ligera de Aximab con injerto de CDR. Definiciones de CDR y numeración de la secuencia de proteínas según Kabat. Las secuencias de nucleótidos y de proteínas de la CDR están en negrita. Los cambios con respecto a la secuencia murina están subrayados en (C) y (D). El marco de la línea germinal aceptor humano es IGHV2-5.

45 Descripción detallada

I. Visión general

La presente invención se refiere a composiciones y métodos relacionados con los anticuerpos monoclonales anti-factor XI (aXIMab) para inhibir la trombosis sin comprometer la hemostasia. Como se describe más completamente más adelante, se prepararon anticuerpos monoclonales a partir de una línea celular de ratón designada 1A6 que reconoce y se une a la cadena pesada del factor XI (FXI) de primate (en particular de ser humano), en particular al dominio Apple 3 (A3) de la cadena pesada del FXI humano. Aunque los anticuerpos policlonales anti-FXI están disponibles comercialmente para usos de investigación diagnóstico, estos anticuerpos policlonales no son seguros para su uso en la clínica porque no pueden ser controlarse y su producción depende de la disponibilidad de animales vivos (véase, por ejemplo, Gruber y Hanson (2003) Blood 102:953-955). Por el contrario, los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar consistentemente en cultivos de células, se pueden sintetizar, o purificar, a partir de productos de organismos transgénicos que pueden ir desde hongos a plantas y a animales. Además, aunque los anticuerpos monoclonales de ratón anti-FXI están actualmente disponibles para aplicaciones de investigación, no se han producido anticuerpos monoclonales anti-factor XI específicos para su uso como agentes antitrombóticos seguros *in vivo*.

Una ventaja de los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a epitopo, variantes, o derivados de los mismos, es su seguridad excepcional como agentes anticoagulantes. Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención son mono-específicos del FXI y no inhiben las proteínas esenciales ni interactúan con las moléculas vitales y las vías, ya sea en su forma intacta o cuando se degrada. Esta es una

ventaja de seguridad concreta en comparación con otros agentes antitrombóticos. Específicamente, las dosis de anticuerpo monoclonal anti-factor XI significativamente superiores a la dosis eficaz máxima (por ejemplo, varias veces la dosis máxima eficaz) no produjo ninguna hemorragia adversa ni otros efectos secundarios tóxicos en los sujetos. Por el contrario, todos los demás agentes antitrombóticos, tales como antagonistas de la vitamina K, inhibidores directos e indirectos de las enzimas de coagulación esenciales, inhibidores de plaquetas, agentes fibrinolíticos, y similares son, en última instancia, peligrosos, e incluso mortales, cuando se administran a su dosis máximas eficaces.

Otras ventajas de seguridad de los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención en comparación con otros agentes antitrombóticos, tales como moléculas inhibidores enzimáticos de molécula pequeña o inhibidores de plaquetas, son que los anticuerpos monoclonales de la invención son metabolizados y eliminados sin generación de intermedios metabólicos tóxicos, y su metabolismo es prácticamente independiente de la integridad de las funciones del hígado y del riñón. Además, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención no interaccionan con otros compuestos farmacológicos y no afectan directamente a la actividad ni al metabolismo de otros fármacos, en contraste con otros agentes antitrombóticos.

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención también son útiles como agentes farmacológicos potentes. Como se describe más completamente a continuación, la administración del anticuerpo monoclonal anti-factor XI puede prevenir o tratar enfermedades en las que la actividad del FXI contribuye a la patología. Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención inhiben la formación de trombos sin causar hemorragia y, por lo tanto, proporcionan una opción de tratamiento segura para enfermedades trombooclusivas en sujetos, particularmente en seres humanos. Otra ventaja del anticuerpo monoclonal anti-factor XI en comparación con otros agentes antitrombóticos es que una sola dosis es segura y eficaz durante más de una semana. La mayoría de los agentes antitrombóticos tienen una duración de acción más corta.

II. Definiciones

Cabe destacar que el término "un/uno" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un anticuerpo monoclonal anti-factor XI" representa uno o más anticuerpos monoclonales anti-factor XI. Como tales, los términos "un/uno" (o "una"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento.

El término "hemostasia" tal como se utiliza en el presente documento refiere a un mecanismo coordinado que mantiene la integridad de la circulación de la sangre después de una lesión en el sistema vascular. En la circulación normal sin lesión vascular, las plaquetas no se activan y circulan libremente. La lesión vascular expone el tejido subendotelial al que las plaquetas pueden adherirse. Las plaquetas adherentes atraerán a otras plaquetas circulantes para formar un tapón preliminar que es particularmente útil en el cierre de una fuga en un tubo capilar u otro vaso pequeño. Estos acontecimientos se denominan hemostasia primaria. Normalmente, a esto le sigue rápidamente la hemostasia secundaria que implica una cascada de reacciones enzimáticas unidas que dan como resultado la coagulación plasmática para reforzar el tapón de plaquetas primario. De acuerdo con lo anterior, un agente hemostático es cualquier agente que ralentiza detiene hemorragias mediante estimulación o potenciación cualquiera de los procesos fisiológicos implicados en la hemostasia, incluyendo la contracción de los vasos sanguíneos, la adherencia y la agregación de elementos sanguíneos formados, y la coagulación de la sangre o el plasma.

El término "coagulación", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de polimerización de monómeros de fibrina, lo que da lugar a la transformación de la sangre o el plasma de un líquido a una fase de gel. La coagulación de la sangre líquida puede producirse *in vitro*, intravascularmente o en una superficie de tejido expuesto y dañado. La coagulación de la sangre *in vitro* da lugar a una sangre gelificada que mantiene los componentes celulares y otros componentes de la sangre esencialmente a las mismas proporciones relativas que se encuentran en la sangre no coagulada, a excepción de una reducción en el contenido de fibrinógeno y un aumento correspondiente de la fibrina. Por "coágulo de sangre" se entiende un gel viscoso formado por componentes de la sangre, y que contienen todos ellos, en las mismas proporciones relativas que se encuentran en la sangre líquida.

El término "cascada de coagulación" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a tres vías enzimáticas interconectadas como describe, por ejemplo, Manolin en Wilson et al. (eds.): Harrison's Principle of Internal Medicine, 14^a Ed. New York. McGraw-Mill, 1998, p. 341. La vía de la coagulación intrínseca da lugar a la formación del factor IXa, que, junto con los factores VIIIa y X, fosfolípidos y Ca²⁺ da el factor Xa. La vía extrínseca da los factores Xa y IXa después de la combinación del factor tisular y el factor VII. La vía de coagulación común interacciona con los factores de coagulación de la sangre V, VIII, IX y X para escindir la protrombina en trombina (factor IIa), que después puede escindir el fibrinógeno en fibrina. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "polipéptido" abarque un "polipéptido" en singular así como "polipéptidos" en plural, y se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos," o cualquier otro término utilizado para hacer referencia a una

cadena o cadenas de dos o más aminoácidos están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de cualquiera de estos términos o de forma intercambiable con los mismos. Asimismo, con el término "polipéptido" se pretende hacer referencia a los productos de las modificaciones postexpresión del polipéptido, incluyendo, sin limitaciones, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o se puede producir mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo mediante síntesis química.

10 Un polipéptido de la invención puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen tal estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se conocen como plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que puede adoptar un gran número de diferentes conformaciones, se conocen como desplegados. Por polipéptido "aislado" o fragmento, variante, o derivado del mismo, se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel de purificación concreto. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede extraerse de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para el objetivo de la invención, dado que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o purificados parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada.

También se incluyen como polipéptidos de la presente invención los fragmentos, derivados, análogos, o variantes de los polipéptidos anteriores y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" cuando se refiere a anticuerpos monoclonales anti-factor XI o polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen cualquier polipéptido que retiene al menos algunas de las propiedades de unión a antígeno del correspondiente anticuerpo o polipéptido de anticuerpo de la invención. Los fragmentos de polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpos específicos tratados en otro lugar del presente documento. Las variantes de los anticuerpos monoclonales anti-factor XI y los polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser de origen natural o de origen no natural. Las variantes de origen no natural se pueden producir usando técnicas de mutagénesis conocidas en la materia. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Los derivados de anticuerpos monoclonales anti-factor XI y los polipéptidos de anticuerpos de la presente invención son polipéptidos que han sido alterados con el fin de que exhiban características adicionales que no se encuentran en el anticuerpo o polipéptido de anticuerpo de referencia de la invención. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Los polipéptidos variantes también pueden denominarse en el presente documento "análogos de polipéptidos." Tal como se usa en el presente documento, un "derivado" de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI o polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido sujeto que tiene uno o más restos derivados químicamente mediante reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, la 4-hidroxi prolina se puede sustituir por prolina; la 5-hidroxi lisina se puede sustituir por lisina; la 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; la homoserina se puede sustituir por serina; y la ornitina se puede sustituir por lisina.

45 Con el término "polinucleótido" se pretende abarcar un ácido nucleico en singular, así como ácidos nucleicos en plural, y hace referencia a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" hace referencia a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal anti-factor XI contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen *in vivo* o *in vitro* transcritos de ARN de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención incluyen además las moléculas producidas de forma sintética. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico pueden ser o pueden incluir un elemento regulador tal como un promotor, un sitio de unión al ribosoma o un terminador de la transcripción.

60 Como se usa en el presente documento, una "región de codificación" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar como parte de una región de codificación, pero ninguna de las secuencias flanqueantes, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones, y similares, no son parte de una región de codificación. Dos o más regiones de codificación de la presente invención pueden estar presentes en una única construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un único vector, o en

construcciones de polinucleótidos separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región de codificación, o puede comprender dos o más regiones de codificación, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención pueden codificar regiones de codificación heterólogas, fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal anti-factor XI o fragmento, variante, o derivado del mismo. Las regiones de codificación heterólogas incluyen, sin limitaciones, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal de secreción o un dominio funcional heterólogo.

En ciertas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la traducción asociado operativamente asociado con una o más regiones de codificación. Una asociación operable es cuando una región de codificación para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociado con una o más secuencias reguladoras de forma que se realiza la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la o las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tal como una región de codificación de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están "asociados operablemente" si la función de inducción del promotor da lugar a la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN que no se va a transcribir. Por tanto, una región promotora estaría asociada operablemente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor era capaz de efectuar la transcripción de dicho ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de la célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar asociados operablemente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de la célula. Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción y la traducción son bien conocidos en la material.

La presente invención está dirigida a ciertos anticuerpos monoclonales anti-factor XI o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos. A menos que se haga referencia específicamente a anticuerpos de tamaño completo como anticuerpos de origen natural, la expresión "anticuerpos monoclonales anti-factor XI" abarca anticuerpos de tamaño completo, así como fragmentos de unión a antígeno, variantes, análogos, o derivados de tales anticuerpos, por ejemplo, moléculas de anticuerpo o de inmunoglobulina de origen natural o moléculas o fragmentos de anticuerpo -modificados mediante ingeniería que se unen al antígeno de una manera similar a las moléculas de anticuerpo.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan en el presente documento de forma intercambiable. Un anticuerpo o inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de las inmunoglobulinas en sistemas de vertebrados están relativamente bien conocidas. Véase, por ejemplo, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Como se tratará con más detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta, o epsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellos (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena lo que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgG, IgA, IgD, o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para el experto en la materia en vista de la presente divulgación y, en consecuencia, están dentro del alcance de la presente invención. Aunque todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente invención, en general, la siguiente discusión se dirigirá a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular 53.000-70.000 Daltons. Las cuatro cadenas normalmente están unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras agrupan las cadenas pesadas a partir de la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican en cadenas kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí y las partes de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando se generan las inmunoglobulinas mediante hibridomas, linfocitos B o células huésped manipuladas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos se ejecutan desde un extremo N los extremos bifurcados de la configuración en Y al extremo C en la parte inferior de cada cadena.

Ambas cadenas, ligera y pesada, se dividen en regiones de homología estructural y funcional a las que se hace referencia como la "región constante" y la "región variable". Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables tanto de las porciones de la cadena ligera

C_{H3} En la invención también están incluidos los fragmentos de unión al antígeno que comprenden cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.939,598 de Kucherlapati et al.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio C_{H1}, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media, y/o inferior), un dominio C_{H2}, un dominio C_{H3} o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que

15 comprende un dominio C_{H1}, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio C_{H2}; una cadena polipeptídica que comprende un dominio C_{H1} y un dominio C_{H3}; una cadena polipeptídica que comprende un dominio C_{H1}, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio C_{H3}, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio C_{H1}, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio C_{H3}.

20 Además, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede carecer de al menos una porción de un dominio C_{H2} (por ejemplo, la totalidad o parte de un dominio C_{H2}). Como se ha expuesto anteriormente, el experto en la materia comprenderá que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de tal manera que varía su secuencia de aminoácidos con respecto a la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

25 Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos divulgados en el presente documento pueden describirse o especificarse en términos del o los epítomos o partes de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana (factor XI humano, descrito en la SEQ ID NO: 1) que reconocen o las que se unen específicamente. La porción de un polipéptido diana que interacciona específicamente con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo es un "epítomo", o un "determinante antigénico". Un polipéptido diana puede

30 comprender un único epítomo, pero normalmente comprende al menos dos epítomos, y puede incluir cualquier número de epítomos, dependiendo del tamaño, la conformación y el tipo de antígeno. Además, cabe destacar que un "epítomo" en un polipéptido diana puede ser o incluir elementos no polipeptídicos, por ejemplo, un epítomo puede incluir una cadena lateral de hidrato de carbono.

35 Se piensa que el tamaño mínimo de un epítomo peptídico o polipeptídico tiene de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítomos peptídicos o polipeptídicos contienen preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve y lo más preferentemente entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítomo no tienen que ser contiguos y, en algunos casos,

40 pueden incluso no estar en la misma cadena peptídica. En la presente invención, el epítomo peptídico o polipeptídico reconocido por los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la presente invención se localiza en la cadena pesada del factor XI humano y contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos del factor XI humano (SEQ ID

45 NO:1).

Por "se une específicamente", por lo general se entiende que un anticuerpo se une a un epítomo a través de su dominio de unión a antígeno y que la unión conlleva alguna complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítomo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítomo cuando se une a ese epítomo, a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítomo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa por la cual un determinado anticuerpo se une a un determinado epítomo. Por ejemplo, puede estimarse que el anticuerpo "A" tiene una mayor especificidad para un epítomo dado que el anticuerpo "B", o se puede decir que el anticuerpo "A" se une al epítomo "C" con una mayor especificidad de la que tiene para el epítomo relacionado "D".

50 Por "se une preferentemente", se entiende que el anticuerpo se une específicamente a un epítomo más fácilmente de lo que se uniría a un epítomo similar, homólogo o análogo relacionado. Por lo tanto, sería más probable que un anticuerpo que "se une preferentemente" a se una a dicho epítomo que a un epítomo relacionado, a pesar de que dicho anticuerpo puede reaccionar de manera cruzada con el epítomo relacionado.

60 A modo de ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítomo preferentemente si se une a dicho primer epítomo con una constante de disociación (K_D) que es inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítomo. En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítomo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítomo. En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítomo con una afinidad que es al

menos dos órdenes de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una velocidad de disociación (k_{off}) que es inferior a la k_{off} del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo.

Se puede decir que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo divulgado en el presente documento se une a un polipéptido diana divulgado en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de disociación (k_{off}) menor o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-3} s^{-1} . Más preferentemente, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a polipéptido diana divulgado en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de disociación (k_{off}) menor o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-7} s^{-1} .

Se puede decir que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo divulgado en el presente documento se une a un polipéptido diana divulgado en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de asociación (k_{on}) mayor o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferentemente, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a polipéptido diana divulgado en el presente documento o un fragmento o variante del mismo con una velocidad de asociación (k_{on}) mayor o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Se dice que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si preferentemente se une a ese epítipo en la medida en que bloquea, en algún grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier método conocido en la materia, por ejemplo ensayos ELISA de competición. Se puede decir que un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 %, o al menos 50 %.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harrow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.) páginas 27–28. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow, las páginas 29–34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítipos específicos, como con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo de alta repetición, tal como un polímero, sería una de alta avidez.

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d de menos de $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, 10^{-2} M , $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10^{-3} M , $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-4} M , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-6} M , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, 10^{-7} M , $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, 10^{-8} M , $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, 10^{-9} M , $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, 10^{-10} M , $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, 10^{-11} M , $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, 10^{-12} M , $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, 10^{-13} M , $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, 10^{-14} M , $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, o 10^{-15} M .

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo quimérico" se empleará para hacer referencia a cualquier anticuerpo en el que la región o sitio inmunorreactivo se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificado de acuerdo con la presente invención) se obtiene a partir de una segunda especie. En realizaciones preferidas, la región o sitio de unión a la diana procederá de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo manipulado" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable, ya sea en la cadena pesada o ligera o en ambas se ve alterado por al menos una sustitución parcial de una o más CDR de un anticuerpo de especificidad conocida y, si es necesario, mediante la sustitución parcial de la región marco parcial y el cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones de marco, se prevé que las CDR derivan de un anticuerpo de diferente clase y, preferentemente, de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo manipulado en el que una o más CDR "donantes" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injerta en una región marco de cadena pesada o ligera humana se denomina en el presente documento "anticuerpo humanizado". Puede que no sea necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas del dominio variable del donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede que solo sea necesario transferir los restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión objetivo.

También se reconoce que las regiones marco dentro del dominio variable de una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado puede comprender únicamente restos de origen humano, en cuyo caso estas regiones marco del anticuerpo humanizado se conocen como "regiones marco completamente humanas". Como alternativa, uno o más restos de la o las regiones marco del dominio variable del donante pueden modificarse por ingeniería dentro de la posición correspondiente de la o las regiones marco humanas de un dominio variable de una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado si es necesario para mantener la adecuada unión o para mejorar la unión al antígeno del factor XI humano. Una región marco humana que se ha modificado por ingeniería de esta manera comprendería una mezcla de restos marco humanos y de los donantes, y se denomina en el presente documento "región marco parcialmente humana." Teniendo en cuenta las explicaciones expuestas en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370, estarán dentro de la competencia de los expertos en la materia, ya sea mediante la realización de experimentos de rutina o por pruebas de ensayo y error para obtener un anticuerpo modificado por ingeniería funcional o humanizado.

Por ejemplo, la humanización de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo CDR de roedor o mutantes de roedor o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI humano. Véanse también las patentes de EE.UU. n.º 5.225,539; 5.585,089; 5.693,761; 5.693,762; 5.859,205. El anticuerpo monoclonal anti-factor XI humanizado resultante comprendería al menos una CDR de roedor o mutante de roedor dentro de las regiones marco completamente humanas del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo humanizado. En algunos casos, los restos dentro de las regiones marco de uno o más dominios variables del anticuerpo monoclonal anti-factor XI humanizado se sustituyen por los correspondientes restos no humanos (por ejemplo, de roedor) (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370), en cuyo caso el anticuerpo monoclonal anti-factor XI humanizado resultante comprendería regiones marco parcialmente humanas dentro del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al. (1986) Nature 331:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329; y Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. De acuerdo con lo anterior, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos marco se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.225,539; 5.585,089; 5.693,761; 5.693,762; 5.859,205. Véase también la patente de Estados Unidos n.º 6.180.370, y la Publicación Internacional n.º WO 01/27160, en las que se divulgan anticuerpos humanizados y las técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen mejor afinidad por un antígeno predeterminado.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido plegado correctamente" incluye polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-factor XI) en el que todos los dominios funcionales que comprenden el polipéptido son claramente activos. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido plegado incorrectamente" incluye polipéptidos en los que al menos uno de los dominios funcionales del polipéptido no se encuentra activo. En una realización, un polipéptido plegado correctamente comprende cadenas polipeptídicas unidas por al menos un enlace disulfuro y, a la inversa, un polipéptido plegado incorrectamente comprende cadenas polipeptídicas no unidas por al menos un enlace disulfuro.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "modificado por ingeniería" incluye la manipulación de las moléculas de ácido nucleico o de polipéptido por medios sintéticos (por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis peptídica *in vitro*, mediante acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas).

El término "expresión" como se usa en el presente documento se refiere a un proceso por el cual un gen produce una sustancia bioquímica, por ejemplo, un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitaciones, inactivación de genes, así como tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Incluye, sin limitaciones, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), y la traducción de dicho ARNm en el o los polipéptidos. Si el producto final deseado es una sustancia bioquímica, la expresión incluye la creación de dicha sustancia bioquímica y cualquier precursor. La expresión de un gen produce un "producto génico". Como se usa en el presente documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido mediante la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen además ácidos nucleicos con

modificaciones postranscripcionales, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, metilación, glicosilación, la adición de los lípidos, la asociación con otras subunidades de proteínas, escisión proteolítica, y similares.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, como la progresión de un estado de enfermedad. Resultados clínicos beneficiosos o
 10 deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estable (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, alivio o paliación del estado de la enfermedad y remisión (parcial o total), sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia prevista si no está recibiendo tratamiento. Aquellos están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya presentan la afección o trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno debe prevenirse.

15 Por sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea el diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, animales domésticos, animales de granja, de zoológicos, deportivos o animales de compañía tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, y similares.

20 Tal como se usa en el presente documento, frases tales como "un sujeto que se beneficiaría de la administración de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI " y "un animal en necesidad de tratamiento" incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que podrían beneficiarse de la administración de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI utilizado, por ejemplo, para inhibir la trombosis con un anticuerpo monoclonal anti-factor XI.

25 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, de ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la materia. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Syntheses*; Mullis et al., patente de Estados Unidos n.º 4.683.195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland).

45 Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2ª ed.; Oxford Univ. Press). Principios generales de la ingeniería de anticuerpos se exponen en Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Principios generales de anticuerpos y unión anticuerpo-hapteno unión se exponen en: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, MA); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman y Hall, New York, NY). Adicionalmente, los métodos estándar en inmunología conocidos en la materia y no descritos específicamente siguen generalmente lo indicado en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8ª ed; Appleton & Lange, Norwalk, CT) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

55 Trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de la inmunología incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) *Kuby Immunology* (4ª ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) *Immunology* (6ª ed.; London: Mosby); Abbas et al (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5ª ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann y Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press).

65

III. Factor XI humano

El factor XI humano es una glicoproteína bicatenaria con un peso molecular de aproximadamente 160.000 daltons. Las dos cadenas son polipéptidos idénticos unidos por puentes disulfuro con pesos moleculares de aproximadamente 80.000 daltons. El factor XI es activado en el factor XIa por el factor XIIa. La secuencia de aminoácidos del factor XI humano se ha determinado (véase, por ejemplo, Fujikawa et al. (1986) *Biochemistry* 25:2417–2424) y se proporciona como la SEQ ID NO:1. En seres humanos, el gen para FXI está situado en el extremo distal del cromosoma 4 (4q35,2) y contiene 15 exones repartidos por ~25 kb de ADN genómico (Asaki et al (1987) *Biochemistry* 26:7221–7228; Kato et al. (1989) *Cytogenet. Cell Genet.* 52:77).

El sitio de escisión para la activación del factor XI por el factor XIIa es un enlace peptídico interno entre Arg-369 e Ile-370 en cada cadena polipeptídica (Fujikawa *et al.* (1986) *Biochemistry* 25:2417–2424). Cada cadena pesada del factor XIa (369 aminoácidos) contiene cuatro repeticiones en tándem de 90-91 aminoácidos denominados dominios apple (designados A1-A4) más un péptido de conexión corto (Fujikawa *et al.* (1986) *Biochemistry* 25:2417-2424; Sun et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 36373–36378). Las cadenas ligeras del factor XIa (cada uno de 238 aminoácidos) contienen la porción catalítica de la enzima con las secuencias que son típicas de la familia de la tripsina de las serina proteasas (Fujikawa *et al.* (1986) *Biochemistry* 25:2417–2424). XIa escinde proteolíticamente su sustrato, el factor IX, en una interacción que requiere el dominio A3 del factor XI (Sun, Y., y Gailani, D. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 29023–29028).

IV. Anticuerpos monoclonales anti-Factor XI

En una realización, la presente invención está dirigida a ciertos anticuerpos monoclonales anti-factor XI, incluidos los fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal anti-factor XI" es un anticuerpo que reconoce específicamente el factor XI humano, en particular un epítipo en el dominio A3 de la cadena pesada del FXI humano (posiciones 182 a 265 de la SEQ ID NO:1). En una realización, el epítipo comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más aminoácidos del dominio A3 del FXI humano. En otra realización, el epítipo se selecciona del grupo que consiste en: a) los aminoácidos 183 a 197 de la (SEQ ID NO:1; b) los aminoácidos 203 a 204 de la SEQ ID NO:1; c) los aminoácidos 234 a 236 de la SEQ ID NO:1; d) los aminoácidos 241 a 243 de la SEQ ID NO:1; e) los aminoácidos 252 a 254 de la SEQ ID NO:1; y f) los aminoácidos 258 a 260 de la SEQ ID NO:1. En realizaciones particulares, el epítipo se selecciona del grupo que consiste en: a) los aminoácidos 183 a 197 de la SEQ ID NO:1; b) los aminoácidos 252 ta 254 de la SEQ ID NO:1; y c) los aminoácidos 258 a 260 de la SEQ ID NO:1.

En otra realización, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención tienen especificidad de unión a un antígeno que es un péptido que comprende 2 o más aminoácidos fuera del dominio A3 de la cadena pesada del FXI humano (posiciones 182 a 265 de la SEQ ID NO:1). En aún otra realización, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención tienen especificidad de unión a un antígeno que es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a) los aminoácidos 183 a 197 de la (SEQ ID NO:1; b) los aminoácidos 203 a 204 de la SEQ ID NO:1; c) los aminoácidos 234 a 236 de la SEQ ID NO:1; d) los aminoácidos 241 a 243 de la SEQ ID NO:1; e) los aminoácidos 252 a 254 de la SEQ ID NO:1; y f) los aminoácidos 258 a 260 de la SEQ ID NO:1. En realizaciones particulares, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención tienen especificidad de unión a un antígeno que es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: a) los aminoácidos 183 a 197 de la SEQ ID NO:1; b) los aminoácidos 252 ta 254 de la SEQ ID NO:1; y c) los aminoácidos 258 a 260 de la SEQ ID NO:1.

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos, son biológicamente activos. La expresión "biológicamente activo" como se utiliza en el presente documento se refiere a una o más de las siguientes actividades fisiológicas asociadas con la actividad antitrombótica de los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención: 1) la inhibición de la actividad de coagulación del factor XI activado; 2) la prevención de la activación del factor XI; y 3) la aceleración de la eliminación del factor XI del sistema circulatorio de un sujeto.

En una realización, la expresión "biológicamente activo" se refiere a la inhibición de la actividad de coagulación del factor XI humano activado. La frase "inhibir la actividad de coagulación" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la disminución de la capacidad del factor XI activado para producir la formación de coágulos de sangre. Los métodos para determinar si la actividad de coagulación se ha inhibido incluyen el uso de ensayos para medir la fuerza del coágulo y/o la duración de tiempo antes de la formación de coágulos en muestras de plasma o de sangre entera. De acuerdo con lo anterior, inhibir la actividad de coagulación como se usa en el presente documento se refiere a invertir al menos parcialmente el efecto de un coagulante, incluyendo una inversión de al menos 5 %, una inversión de al menos 10 %, una inversión de al menos 20 %, una inversión de al menos 30 %, una inversión de al menos 40 %, una inversión de al menos 50 %, una inversión de al menos 60 %, una inversión de al menos 70 %, una inversión de al menos 80 %, una inversión de al menos 90 %, y hasta, e incluyendo, una inversión de 100 %. El término "inversión" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un alargamiento del tiempo de inicio de la formación de coágulos o una disminución de la fuerza del coágulo. Los ensayos para la medición del inicio de la formación de coágulos y la fuerza de los coágulos son bien conocidos en la materia incluyen el tiempo de

tromboplastina parcial activada (TTPA), tromboelastografía (TEG®), y control continuo de la generación de trombina utilizando el sistema de Thrombinoscope® (véase, por ejemplo, Banez et al. (1980) *Am. J. Clin. Pathol.*, 74:569–574; van den Besselaar et al. (1990) *Thromb. Haemost.*, 63:16–23; Kawasaki et al. (2004) *Anesthesia & Analgesia*, 99:1440–1444; Hemker et al. (2003) *Pathophysiology of Haemostasis & Thrombosis*, 33:4–15).

5 En una realización, el anticuerpo monoclonal de la invención se produce en la línea celular de hibridoma 1A6.

Los anticuerpos anti-factor XI de la invención comprenden la región determinante de la complementariedad (CDR) optimizada. Por “CDR optimizada” se entiende la CDR que se ha modificado y se han seleccionado secuencias optimizadas basadas en la mejora de la afinidad de unión y/o mejora de la actividad de CDC impartida a un anticuerpo anti-factor XI que comprende la CDR optimizada. Las modificaciones implican la sustitución de restos de aminoácidos dentro de la CDR de tal manera que un anticuerpo anti-factor XI conserve la especificidad por el antígeno del factor XI y tiene una afinidad de unión y/o actividad anti-factor XI mejorada o sostenida. La actividad XI anti-factor XI de un anticuerpo anti-factor XI de la invención está mejorada o se mantiene en comparación con aXIMab (1A6) en un ensayo funcional tal como se describe en el presente documento. Las CDR optimizadas de la invención se utilizan en los dominios V_H y V_L de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, de los anticuerpos anti-factor XI humanos. Los ejemplos de anticuerpos anti-factor XI de la invención comprenden un dominio V_H seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3 y 7, y/o un dominio V_L seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5 y 9.

20 Las CDR optimizadas comprenden las secuencias expuestas en las SEQ ID NO:10–15.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-factor XI son inmunoglobulinas IgG kappa. En dichas realizaciones, la inmunoglobulina IgG kappa puede comprender una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 dentro de una cadena pesada de la inmunoglobulina y una región constante kappa humana dentro de una cadena ligera de la inmunoglobulina. En realizaciones particulares, la inmunoglobulina IgG kappa comprende regiones marco completa o parcialmente humanas dentro del dominio variable de la cadena pesada y en el dominio variable de la cadena ligera. En otras realizaciones particulares, la inmunoglobulina IgG kappa comprende regiones marco murinas dentro del dominio variable de la cadena pesada y en el dominio variable de la cadena ligera.

En realizaciones adicionales de la invención, los anticuerpos anti-factor XI de la invención comprenden un dominio V_H que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 3 o 7 y/o un dominio V_L que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEC ID NO: 5 y 9, o las secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 80 %, 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9.

En aún otras realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-factor XI de la invención comprenden un dominio V_H, en el que el dominio V_H se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un dominio V_H que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO:3 o 7; y
- b) un dominio V_H que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO:3 o 7.

En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-factor XI de la invención comprenden un dominio V_L, en el que el dominio V_L se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un dominio V_L que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO:5 o 9; y
- b) un dominio V_L que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO:5 o 9.

Los métodos para medir la especificidad de unión del anticuerpo anti-factor XI incluyen, aunque sin limitaciones, ensayos de unión competitiva estándar, los ensayos para el control de la secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos T o linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos T, ensayos de apoptosis, ensayos ELISA, y similares. Véase, por ejemplo, los ensayos divulgados en el documento WO 93/14125; Shi et al. (2000) *Immunity* 13:633–642; Kumanogoh et al. (2002) *J Immunol* 169:1175–1181; Watanabe et al. (2001) *J Immunol* 167:4321–4328; Wang et al. (2001) *Blood* 97:3498–3504; y Giraudon et al. (2004) *J Immunol* 172(2):1246–1255.

Variantes biológicamente activas adecuadas de los anticuerpos anti-factor XI se pueden utilizar en los métodos de la presente invención. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo anti-factor de XI original. Los métodos para preparar variantes de anticuerpos están generalmente disponibles en la técnica. Por ejemplo, las variantes de la secuencia aminoacídica de un anticuerpo anti-factor XI, una región de anticuerpo, o un dominio variable de una cadena pesada o ligera del anticuerpo, se pueden preparar mediante mutaciones en la secuencia de ADN clonado que codifica la secuencia de aminoácidos de interés. Los métodos para la mutagénesis y alteraciones de secuencias nucleotídicas son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Walker y Gastra,

eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488–492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367–382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); la patente de Estados Unidos n.º 4.873.192; y las referencias citadas en los mismos. Orientación en cuanto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés se puede encontrar en el modelo de Dayhoff et al. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345–352. El modelo de Dayhoff *et al.* usa la matriz de similitud de aminoácidos en la mutación puntual aceptada (PMA) (matriz PAM 250) para determinar las sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas. Se pueden preferir las sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos como se enseña en la matriz PAM 250 del modelo de Dayhoff et al. incluyen, sin limitaciones, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln y Phe↔Trp↔Tyr.

En la construcción de variantes de los polipéptidos del anticuerpos anti-factor XI de interés se hacen modificaciones de forma que las variantes sigan teniendo las propiedades deseadas, es decir, sean capaces de unirse específicamente a un antígeno del factor XI humano expresado en la superficie de una célula humana o secretado por la misma, y que tiene actividad de bloqueo del factor XI, como se describe en el presente documento. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica la variante polipeptídica no debe colocar la secuencia fuera del marco de lectura y, preferentemente, no crearán regiones complementarias que pudieran producir una estructura de ARNm secundaria. Véase la publicación de solicitud de patente EP n.º 75.444.

Además, la región constante de un anticuerpo anti-factor XI se puede mutar de varias formas para alterar la función efectora. Por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos n.º 6.737.056B1 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/0132101A1, que divulgan mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a los receptores de Fc.

Preferentemente, las variantes de un anticuerpo anti-factor XI de referencia tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la molécula de anticuerpo anti-factor XI de referencia o con una porción más corta de la molécula de anticuerpo de referencia. Más preferentemente, las moléculas comparten al menos aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia. Cuando se trata en el presente documento, se puede determinar si cualquier polipéptido concreto, incluidas las regiones constantes, las CDR, los dominios V_H y los dominios V_L divulgados en el presente documento, es al menos aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o incluso aproximadamente 100 % idéntico a otro polipéptido usando métodos y programas/software informático conocidos en la materia, tales como, entre otros, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482–489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Al usar BESTFIT o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia determinada es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se fijan de un modo tal que el porcentaje de identidad se calcula sobre la totalidad de la longitud de la secuencia polipeptídica de referencia y que se permiten los huecos de homología en hasta un 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Para los fines de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith–Waterman con una búsqueda de huecos afines con una penalización de hueco abierto de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith–Waterman se enseña en Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482–489. Una variante puede, por ejemplo, diferir del anticuerpo anti-factor XI en tan solo de 1 a 15 restos de aminoácidos, tan solo de 1 a 10 restos de aminoácidos, tal como 6–10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 un resto de aminoácido.

Con respecto a la alineación óptima de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener restos de aminoácidos adicionales o restos de aminoácidos eliminados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 restos de aminoácidos contiguos, y puede ser de 30, 40, 50, o más restos de aminoácidos. Se pueden realizar correcciones sobre la identidad de secuencia asociadas con sustituciones conservadoras de restos o huecos (véase el algoritmo de búsqueda de homología de Smith–Waterman).

Cuando dos cualesquiera de las secuencias de polipéptidos están alineadas de manera óptima para la comparación, se reconoce que los restos que aparecen uno frente al otro dentro de la alineación ocupan posiciones dentro de sus respectivos polipéptidos que corresponden el uno al otro. Tales posiciones se denominan en el presente documento

"posiciones correspondientes" y los restos que residen en las posiciones correspondientes se conocen como "restos correspondientes" o restos que "corresponden" uno a otro. Por tanto, por ejemplo, cuando polipéptido de interés está alineado de manera óptima con una secuencia polipeptídica de referencia que tiene, por ejemplo, 10 restos, el resto dentro del polipéptido de interés que aparece en el resto opuesto 5 de la secuencia de referencia se conoce como el

5 "resto en la posición correspondiente al resto 5 "de la secuencia de referencia.

La estructura química exacta de un polipéptido capaz de unirse específicamente al factor XI y que retiene la actividad de bloqueo del factor XI deseada depende de una serie de factores. Dado que en la molécula hay presentes grupos amino y carboxilo ionizables, se puede obtener un polipéptido concreto, como una sal ácida o

10 básica, o en forma neutra. Todas estas preparaciones que conservan su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas están incluidas en la definición de anticuerpos anti-factor XI, como se usan en el presente documento. Además, la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido puede aumentarse mediante derivatización usando restos de azúcar (glicosilación) o con otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse mediante conjugación con sacáridos. Determinados

15 aspectos de dicho aumento se consiguen a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; se pueden introducir otras de estas modificaciones *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones se incluyen en la definición de un anticuerpo anti-factor XI usado en el presente documento, siempre que no se destruyan las propiedades deseadas del anticuerpo anti-factor XI. Cabe esperar que tales modificaciones puedan afectar cuantitativa o cualitativamente a la actividad, ya sea mediante el aumento o la disminución de la actividad del

20 polipéptido, en los diversos ensayos. Además, los restos de aminoácidos individuales en la cadena pueden modificarse mediante oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retienen la actividad. Tales alteraciones que no destruyen las propiedades deseadas (es decir, la especificidad de unión para el factor XI y actividad de bloqueo del factor XI) no eliminan la secuencia polipeptídica de la definición de anticuerpos anti-factor XI de interés, como se usa en el presente documento.

25 La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y el uso de variantes de polipéptidos. En la preparación de las variantes de anticuerpos anti-factor XI, uno experto en la materia pueden determinar fácilmente qué modificaciones en la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de la proteína nativa se traducirá en una variante que sea adecuada para su uso como componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los métodos de la presente invención.

En determinados anticuerpos anti-factor XI, la porción Fc se puede mutar para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros

35 medios) de un dominio de la región constante pueden reducir la unión al receptor de FC del anticuerpo modificado circulante, de modo que se incrementa la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante consistentes con la presente invención moderan la unión del complemento y, por tanto, reducen la servida en suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Otras modificaciones más de la región constante se pueden usar para modificar los enlaces disulfuro o los restos oligosacáridos que permiten potenciar la localización debido a un incremento de la especificidad por el antígeno o de la flexibilidad del anticuerpo.

40 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, se pueden medir fácilmente y cuantificar usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación indebida.

Los anticuerpos anti-factor XI de la invención también incluyen derivados que se han modificado, por ejemplo

45 mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no impide la unión específica del anticuerpo a su epitopo afín. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado mediante, por ejemplo, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo

50 mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Una "sustitución conservadora de aminoácido" es una en la que el resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se han definido familias de restos

55 de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.

60 ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, se pueden introducir mutaciones aleatorias a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden someter a detección selectiva según la actividad biológica para identificar mutantes que conserven actividad (por ejemplo, la capacidad para unirse a un polipéptido anti-factor XI).

65 Por ejemplo, es posible introducir mutaciones únicamente en las regiones estructurales o únicamente en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silenciosas o mutaciones

neutras de sentido erróneo, es decir que tienen ninguno, o poco efecto, sobre la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Como alternativa, las mutaciones no neutras de sentido erróneo pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno. Es probable que la localización de la mayoría de las mutaciones silenciosas o neutras de sentido erróneo sea en las regiones estructurales, mientras que es probable la localización de la mayoría de las mutaciones no neutras de sentido erróneo sea en las CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la técnica sería capaz de diseñar y analizar moléculas mutantes con propiedades deseadas, tales como la ausencia de alteración de la actividad de unión a antígeno o la alteración en la actividad de unión (p. ej., mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambios en la especificidad del anticuerpo). Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad para unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de un polipéptido del factor XI) se puede determinar usando las técnicas descritas en el presente documento o modificando de forma rutinaria las técnicas conocidas en la materia.

15 V. Conjugados de proteínas de fusión y anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, o los fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, pueden además condensarse de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o el extremo C o conjugarse químicamente (incluidas conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI pueden condensarse de forma 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 PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de Estados Unidos n.º 5,314,995; y el documento EP 396.387.

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-factor XI, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, y un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, el polipéptido heterólogo al que el anticuerpo está fusionado puede ser útil para la función, puede aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos, o puede ser una secuencia marcadora que facilita la purificación o detección (véase, por ejemplo, Leong et al. (2001) *Cytokine* 16:106; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* (2002) 54:531; Weir et al. (2002) *Biochem. Soc. Transactions* 30:512; Gentz et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821–824; Wilson et al. (1984) *Cell* 37:767)

Las proteínas de fusión se pueden preparar usando métodos bien conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.116.964 y 5.225.538). El sitio preciso en el que se realiza la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfecta después a una célula huésped para su expresión.

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la presente invención, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, se pueden usar en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una de diversas moléculas, por ejemplo para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana o para obtención de imágenes o terapia de un sujeto. En particular, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG. Las técnicas para conjugar diversos restos a un anticuerpo anti-factor XI, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo, son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, cd. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pág. 243–56; Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2ª ed.; Marcel Dekker, Inc.), pág. 623–53; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al., pág. 475–506; "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al., Academic Press, pág. 303–16 (1985); y Thorpe et al. (1982) "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody–Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.* 62:119–58.

55 VI. Polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-Factor XI

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos.

En una realización adicional, la presente invención incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica del dominio V_H seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO 3 y 7.

En una realización adicional, la presente invención incluye un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica del dominio V_L

seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO 5 y 9.

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que es al menos aproximadamente 85 % o 100 % idéntico a una secuencia polinucleotídica de referencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, y 8.

Cualquiera de los polinucleótidos puede incluir, además, ácidos nucleicos adicionales, que codifican, por ejemplo, un péptido señal para dirigir la secreción del polipéptido codificado, las regiones constantes de los anticuerpos como se describe en el presente documento, u otros polipéptidos heterólogos como se describe en el presente documento. Asimismo, como se describe con más detalle en otra parte en el presente documento, la presente invención incluye composiciones que comprenden uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente. En una realización, la invención incluye composiciones que comprenden un primer polinucleótido primero y un segundo polinucleótido en el que dicho primer polinucleótido codifica un dominio V_H como se describe en el presente documento y en el que dicho segundo polinucleótido codifica un dominio V_L como se describe en el presente documento. Específicamente, una composición que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un dominio V_H seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3 y 7, y/o un dominio V_L seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5 y 9.

La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otra parte. Adicionalmente, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión, fragmentos Fab, y otros derivados, como se describe en el presente documento, también se contemplan en la invención.

Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., (1994) *BioTechniques* 17:242), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y unión de dichos oligonucleótidos, y, después, amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-factor XI, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, se puede generar a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se dispone de un clon que contenga un ácido nucleico que codifica un anticuerpo concreto, pero se conoce la secuencia de la molécula del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferentemente ARN poliA+, aislado de, cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo u otro anticuerpo anti-factor XI, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda oligonucleotídica específica de la secuencia génica concreta para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo u otro anticuerpo anti-factor XI. Después, los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR se pueden clonar en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-factor XI, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, su secuencia de nucleótidos se puede manipular usando métodos bien conocidos en la materia para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2^a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel et al., eds. (1998) *Current Protocol in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones, y/o inserciones de aminoácidos.

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-factor XI, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo, puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o poldesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-factor XI, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo pueden estar compuesto por ADN mono o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenarios o, más normalmente, bicatenarios, o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-factor XI, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo, puede estar compuesto por regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-factor XI, un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, también puede contener una o más bases modificadas o estructuras de ADN o ARN modificadas por estabilidad o por otras razones. Bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se pueden realizar diversas modificaciones en el ADN y al ARN; por tanto, "polinucleótido" abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (p. ej., una porción de la cadena pesada de inmunoglobulina o porción de la cadena ligera) se puede crear introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina, de un modo tal que se introducen en la proteína codificada una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Las mutaciones se pueden introducir a través de técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida a un sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se realizan en uno o más restos de aminoácidos no esenciales.

VII. Expresión de polipéptidos de anticuerpos

Las secuencias de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo se pueden hacer, ya sea simultáneamente o por separado, utilizando transcriptasa inversa y ADN polimerasa de acuerdo con métodos bien conocidos. La PCR se puede iniciar mediante cebadores de la región constante consenso o mediante cebadores más específicos basados en las secuencias de aminoácido y de ADN de las cadenas pesadas y ligeras publicadas. Como se ha tratado anteriormente, la PCR también se puede utilizar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas se pueden cribar mediante cebadores consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de la región constante de ratón.

El ADN, normalmente ADN plasmídico, se puede aislar de las células usando técnicas conocidas en la materia, se puede mapear con enzimas de restricción y secuenciar de acuerdo con técnicas bien conocidas estándar establecidas con detalle en, por ejemplo, las referencias anteriores en relación con técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la presente invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o el posterior análisis.

Tras la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos anti-factor XI, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-factor XI normalmente se insertan en un vector de expresión para la introducción en células huésped que se pueden usar para producir la cantidad deseada de anticuerpo anti-factor XI.

La expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula objetivo descrita en el presente documento, por ejemplo, el factor XI, requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, una porción del mismo (que preferentemente contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, en el presente documento se describen métodos para preparar una proteína que expresa un polinucleótido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo. Se pueden usar métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican anticuerpos y las señales adecuadas de control de la transcripción y la traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por tanto, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, operablemente unida a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de PCR WO 86/05807; la publicación de PCT WO 89/01036; y las patentes de Estados Unidos n.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo pueden clonarse en dicho vector para la expresión de las cadenas pesada o ligera completas.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento para indicar los vectores usados de acuerdo con la presente invención como vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como conocen los expertos en la materia, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad para entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Para los fines de esta invención, se pueden usar numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector usa elementos de ADN que derivan de virus animales, tales como el virus del papiloma bovino, el virus del polioma, adenovirus, virus vacunal, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión al ribosoma. Además, las células que tienen integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de las células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped autotrófico, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen marcador seleccionable puede estar directamente unido a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducir en la misma célula mediante cotransformación. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima del ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores de la transcripción, potenciadores, y señales de terminación.

En realizaciones particularmente preferidas, los genes clonados de la región variable se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de las cadenas pesada y ligera (preferentemente humanos) sintetizados como ha tratado anteriormente. Por supuesto, cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar la expresión en células eucariotas se puede usar en la presente invención. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, sin limitaciones, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA), y el plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, la detección selectiva de un número grande de células transformadas de las que expresan niveles de inmunoglobulina adecuadamente altos de las cadenas pesadas y ligeras es experimentación de rutina que se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante sistemas robóticos.

Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o la secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo anti-factor XI, el vector de expresión se puede introducir en una célula huésped adecuada. La introducción del plásmido en la célula huésped se puede conseguir mediante varias técnicas bien conocidas en la materia. Estas incluyen, entre otras, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación en fosfato cálcico, fusión celular con ADN encapsulado, microinyección e infección con virus intacto. Véase, Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vectors" en Vectors, ed. Rodriguez y Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Capítulo 24.2, pág. 470-472. Por lo general, la introducción del plásmido en el huésped se produce mediante electroporación. Las células huésped que alojan la construcción de expresión se cultivan en condiciones adecuadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se analizan para determinar la síntesis proteica de cadenas pesadas y/o ligeras. Ejemplos de técnicas de ensayo incluyen el ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis clasificador de células activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y, después, las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para usar en los métodos descritos en el presente documento. Por tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o una cadena pesada o ligera del mismo, operablemente unido a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden co-expresar en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, como se detalla más adelante.

Como se usa en el presente documento, "células huésped" se refiere a las células que albergan vectores contruidos utilizando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de anticuerpos a partir de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para referirse a la fuente de anticuerpos, a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar de células enteras centrifugadas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Para expresar moléculas de anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento se pueden usar varios sistemas de vector de expresión en huésped. Dichos sistemas de expresión en huésped representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias de codificación de interés y, posteriormente, se pueden purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias nucleotídicas codificadoras adecuadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, entre otros, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, de ADN plasmídico o de ADN de cósmido, que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; levaduras (*Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinante de levaduras que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión en virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión en plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinante que contiene promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus, el promotor de 7,5 K del virus vacunal). Preferentemente, las células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y, más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinante enteras, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al. (1986) Gene 45:101; Cockett et al. (1990) Bio/Technology 8:2).

La línea de células huésped usada para la expresión de proteínas suele ser de origen mamífero; se atribuye a los expertos en la materia la capacidad para determinar preferentemente líneas de células huésped particulares que son

- más adecuadas para el producto del gen que se desea expresar en las mismas. Ejemplos de líneas de células huésped incluyen, entre otros, células CHO (de ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR⁻), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea renal de mono), COS (un derivado de la CVI con el antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de hámster neonato), MDCK,293, WI38, R16'10 (fibroblastos de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea renal de hámster), SP2/0 (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-IcIBPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos) y 293 (riñón humano). Las líneas de células huésped normalmente están disponibles en servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivos Tipo o de la literatura publicada.
- Además, se puede escoger una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas de huéspedes adecuados de modo que se asegure una correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Con este fin se pueden usar células huésped eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico.
- Para la producción a largo plazo y con un rendimiento alto de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable la molécula anticuerpo de pueden someter a ingeniería. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado mediante elementos de control de la expresión adecuados (p. ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células modificadas por ingeniería se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y, después, se pasan a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en las líneas celulares. Este método puede usarse de forma ventajosa para modificar mediante ingeniería las líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo.
- Se puede usar una serie de sistemas de selección, incluidos, entre otros, los genes de la timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al. (1977) Cell 11:223), de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202) y de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al. (1980) Cell 22:817) genes que se pueden usar en las células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Asimismo, se puede usar resistencia antimetabolito como la base de la selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al. (1980) Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) Science 260:926-932; y Morgan y Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-215 (May, 1993); e higo, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al. (1984) Gene 30:147. Los métodos conocidos habitualmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al., (1993) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY); Kriegler (1990) "Gene Transfer and Expression" en A Laboratory Manual (Stockton Press, NY); Dracopoli et al. (eds) (1994) Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons, NY) Capítulos 12 y 13; Colberre-Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1.
- Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel (1987) "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Vol. 3. Cuando un marcador en el sistema del vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará ((Crouse et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:257).
- La producción *in vitro* permite aumentar para dar cantidades grandes de los polipéptidos deseados. Las técnicas para cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular se conocen en la materia e incluyen cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo en un reactor aéreo o en un reactor con agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, microesferas de agarosa o cartuchos de cerámica. En caso necesario y/o si se desea, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante métodos de cromatografía habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de inmunofinidad, por ejemplo después de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de la región bisagra sintético o antes de o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en el presente documento.
- Los genes que codifican anticuerpos anti-factor XI, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, de la invención también se pueden expresar en células que no sean de mamífero, tales como bacterias

levaduras o células vegetales. Las bacterias que captan fácilmente ácidos nucleicos incluyen miembros de las familias *Enterobacteriaceae*, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*, *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. También se apreciará que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos normalmente forman parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben aislarse, purificarse y, después, ensamblarse en moléculas funcionales. Cuando se desean formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se autoensamblarán en anticuerpos tetravalentes (documento WO 02/096948A2).

En los sistemas bacterianos, de forma ventajosa se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión en función del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se exprese. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles elevados de productos proteicos de fusión que se purifiquen fácilmente. Tales vectores incluyen, entre otros, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., (1983) EMBO J. 2:1791), en el que la secuencia de codificación del anticuerpo puede ligarse de forma individual en el vector en marco con la región de codificación de lacZ, de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye (1985) Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, (1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción y unión en una matriz de perlas de glutatión-agarosa, seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se han diseñado para que incluyan trombina o sitios de escisión por la proteasa del factor Xa de modo que el producto del gen diana clonado se pueda liberar de la fracción GST.

Además procariontes, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura del pan común, es la más usada entre los microorganismos eucariotas, aunque habitualmente se dispone de otras varias cepas, por ejemplo *Pichia pastoris*.

Para la expresión en *Saccharomyces*, normalmente se usa el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al. (1979) Nature 282:39; Kingsman et al. (1979) Gene 7:141; Tschemper et al. (1980) Gene 10:157). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levaduras que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 (Jones (1977) Genetics 85:12). La presencia de daños en trp1 como característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insectos, como vector para expresar genes extraños normalmente se usa el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV). El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (p. ej., el gen de la poliedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor de AcNPV, por ejemplo el promotor de la poliedrina.

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado de forma recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo mediante cromatografía (p. ej., cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad, particularmente de afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Como alternativa, un método preferido para aumentar la afinidad de los anticuerpos de la invención se divulga en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002-0123057 A1.

VIII. Métodos de uso de anticuerpos monoclonales anti-factor XI

Los métodos se refieren al uso de anticuerpos monoclonales anti-factor XI, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos, para inhibir la trombosis en un sujeto en necesidad de los mismos. Aunque la siguiente discusión se refiere a métodos y tratamiento de diversas enfermedades y trastornos con el anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la invención, los métodos descritos en el presente documento son también aplicables a los fragmentos de unión a antígeno, variantes, y derivados de estos anticuerpos monoclonales anti-factor XI que retienen las propiedades deseadas de los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, es decir, capaces de unirse específicamente al factor XI humano y capaces de inhibir la actividad de coagulación del factor XI humano.

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención se pueden administrar a cualquier sujeto en el que la inhibición de la trombosis sería beneficiosa. En particular, se contempla que los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención son particularmente útiles como agentes antitrombóticos que no comprometen la hemostasia, y como tales son alternativas superiores a los agentes antitrombóticos tradicionales.

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención se pueden utilizar para tratar afecciones caracterizadas por oclusiones vasculares, tales como las que se producen como resultado de la formación de trombos. Las afecciones que se caracterizan por oclusiones vasculares y justifican el tratamiento o prevención usando anticuerpos

monoclonales anti-factor XI incluyen las que afectan a la vasculatura arterial, capilar y venosa.

En las arterias coronarias, a menudo, tras la rotura de la placa aterosclerótica se forman trombos oclusivos. Esta oclusión es la causa principal del infarto agudo de miocardio y de la angina inestable. También se pueden producir oclusiones coronarias tras infecciones, inflamación, terapia trombolítica, angioplastia y colocación de injerto. Se aplican principios similares a otras partes de la vasculatura arterial e incluyen, entre otros, la formación de trombos en las arterias carótidas, que es la principal causa de isquemia transitoria o permanente e ictus.

A menudo se produce trombosis venosa tras estasis, infecciones, reacciones inflamatorias y cirugía mayor de las extremidades inferiores o de la zona abdominal. La trombosis venosa profunda tiene como resultado una reducción del flujo sanguíneo desde la zona distal al trombo y predispone a la embolia pulmonar. La embolia pulmonar es una causa importante de mortalidad posquirúrgica. La coagulación intravascular diseminada (CID) y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) donde los anticuerpos monoclonales de la presente invención habitualmente son útiles habitualmente se producen dentro de todos los sistemas vasculares durante la septicemia bacteriana, la entrada de material extraño en la circulación sanguínea después de, por ejemplo, traumatismo y el parto, reacciones inmunitarias, inflamación, ciertas infecciones virales, ciertos trastornos plaquetarios, y cáncer. La coagulación intravascular diseminada es una complicación grave de muchas enfermedades y algunos tratamientos con fármacos, incluyendo, por ejemplo, la heparina. El consumo trombótico de factores de coagulación y de plaquetas, y la coagulación sistémica da lugar a la formación de trombos que amenazan la vida que se producen a lo largo de la microvasculatura, que conduce a hipoxia local o generalizada e insuficiencia de órganos.

Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos y composiciones para su uso en métodos para inhibir la trombosis en un sujeto en necesidad de los mismos, que comprende administrar al sujeto una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la invención, particularmente cuando la trombosis se asocia con: 1) síndromes coronarios agudos, tales como infarto de miocardio, angina inestable, angina refractaria, trombo coronario oclusivo que se produce tras la terapia trombolítica o tras angioplastia coronaria; 2) síndromes cerebrovasculares isquémicos, incluyendo ictus embólico, ictus trombótico o ataques isquémicos transitorios; 3) trombosis que se produce en el sistema venoso de forma espontánea o en el entorno de malignidad, traumatismo o cirugía, incluyendo tromboembolia pulmonar; 4) cualquier coagulopatía, incluyendo SDRA y CID, por ejemplo, en el entorno de septicemia u otra infección, cirugía, embarazo, traumatismo o malignidad y si está asociada con insuficiencia multiorgánica o no, púrpura trombocitopénica trombótica, tromboangeítis obliterante, o enfermedad trombótica asociada con trombocitopenia inducida por heparina; 5) complicaciones trombóticas asociadas con circulación extracorpórea (por ejemplo, diálisis renal, derivación cardiopulmonar u otro procedimiento de oxigenación, y plasmaféresis); 6) complicaciones trombóticas asociadas con instrumentación (por ejemplo, cateterización cardíaca o intravascular, bomba con balón intraaórtico y endoprótesis coronaria o válvula cardíaca); y 7) complicaciones asociadas con la colocación de dispositivos protésicos.

Como se describe en otra parte del presente documento, los agentes antitrombóticos tradicionales son peligrosos, o incluso fatales, cuando se administran a sus dosis máximas eficaces. De acuerdo con lo anterior, se proporciona un método para reducir una dosis requerida o complementar el efecto de un agente antitrombótico en el tratamiento de la trombosis en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la invención. Los agentes antitrombóticos tradicionales incluyen un inhibidor directo o indirecto de la trombina, un inhibidor del factor X, un inhibidor del factor IX, un inhibidor del factor XII, un inhibidor del factor V, un inhibidor del factor VIII, un inhibidor del factor XIII, un inhibidor del factor VII, un inhibidor del factor tisular, un agente profibrinolítico, un agente fibrinolítico o fibrinogenolítico, un inhibidor de la carboxipeptidasa B, un inhibidor de plaquetas, un agente de reductor selectivo del recuento de plaquetas o un inhibidor del Factor XI.

Los inhibidores directos de la trombina incluyen argatrobán y derivados o análogos del mismo, hirudina y derivados recombinantes o sintéticos o análogos de la misma, derivados de tripéptido Phe-Pro-Arg, derivados de clorometilcetona, ximelagatrán y derivados, metabolitos, o análogos del mismo, inhibidores del exosítio de unión a aniones y aptámeros de ARN/ADN.

Los inhibidores indirectos de la trombina incluyen heparina, cumarina, dermatán y trombomodulina.

Los inhibidores del factor X incluyen inhibidores directos del factor Xa, rivaroxabán, anticuerpos frente al factor X, el factor Xa inactivado, o análogos y derivados de los mismos.

Los inhibidores de Factor IX incluyen anticuerpos frente al factor IX, inhibidores directos del factor IXa o factor IXa inactivado, o análogos y derivados de los mismos.

Los inhibidores del factor XII incluyen inhibidores directos del factor XII, el inhibidor de la tripsina de maíz, los anticuerpos frente al FXII, o al factor XIIa inactivado o análogos y derivados de los mismos.

Los inhibidores del factor V incluyen anticuerpos frente al factor V, la proteína C activada, la proteína S, o análogos y derivados de los mismos.

Los inhibidores del factor VIII incluyen anticuerpos frente al factor FVIII, la proteína C activada, la proteína S, o análogos y derivados de los mismos.

5 Los inhibidores del factor XIII incluyen anticuerpos frente al factor XIII, inhibidores directos del factor XIIIa o el factor XIIIa inactivado.

Los inhibidores del factor VII incluyen anticuerpos contra el factor VII, inhibidor de la vía del factor tisular, el factor VIIa inactivado o inhibidor directo del factor VIIa o análogos y derivados de los mismos.

10 Los inhibidores del factor tisular incluyen el inhibidor de la vía del factor tisular, los anticuerpos contra el factor tisular, o análogos y derivados de los mismos.

Los agentes profibrinolíticos incluyen uroquinasa, estreptoquinasa, activador del plasminógeno tisular o derivados de los mismos.

15 Los agentes fibrinolíticos o fibrinogenolíticos incluyen plasmina, microplasmina, ancrod, o derivados de los mismos.

Los inhibidores plaquetarios incluyen aspirina, clopidogrel, dopyridamol, o derivados de los mismos.

20 Los agentes reductores selectivos del recuento de plaquetas incluyen hidroxiurea, anagrelida, o derivados de los mismos.

Los inhibidores del factor XI incluyen inhibidores directos del factor XIa, otros anticuerpos frente al factor XI, el factor XIa inactivado, o análogos y derivados de los mismos.

25 Se proporciona un método para tratar el cáncer metastásico en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la invención.

30 Se proporciona un método para tratar una reacción inflamatoria aguda en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la invención.

35 Se proporcionan terapias de combinación en las que un anticuerpo monoclonal anti-factor XI es el agente activo primario y se administra junto con un agente activo adicional a un sujeto en necesidad del mismo. Tal terapia de combinación puede llevarse a cabo mediante la administración de los diferentes agentes activos en una única composición, mediante la administración simultánea de los diferentes agentes activos en diferentes composiciones, o mediante administración secuencial de los diferentes agentes activos. La terapia de combinación puede incluir también situaciones en las que el anticuerpo monoclonal anti-factor XI que ya se está administrando al paciente y el agente activo adicional se debe añadir al régimen farmacológico del paciente, así como cuando se administra a diferentes individuos (por ejemplo, médicos u otros profesionales médicos) los componentes separados de la combinación al paciente.

45 El agente activo adicional generalmente, aunque no necesariamente, será uno que sea eficaz en la inhibición de la trombosis. En una realización preferida, el agente activo adicional es un agente hemostático, es decir, un agente que estimula la hemostasia. Los agentes hemostáticos particularmente preferidos para su uso en las terapias de combinación de la presente invención incluyen el factor VII activado (FVIIa) o concentrado del complejo de protrombina activada (CCPA). Tanto el FVIIa como el CCPA se desarrollaron como agentes hemostáticos para el tratamiento de las hemorragias en pacientes con hemofilia que desarrollan inhibidores (Scharer (1999) Haemophilia, 5:253-259; Shapiro et al. (1998) Thromb. Haemost., 80:773-778; Lusher et al. (1980) N. Engl. J. Med., 303:421-425; Sjamsoedin et al. (1981) N. Engl. J. Med., 305:717-21; Negrier et al. (1997) Thromb. Haemost., 77:1113-1119).

50 El ingrediente activo clave del CCPA es la protrombina, que contribuye tanto a la hemostasia como el crecimiento de trombos (Akhavan et al. (2000) Thromb. Haemost., 84:989-997; Xi et al. (1989) Thromb. Haemost., 62:788-791). Por el contrario, se cree que aumentar la concentración en plasma de FVIIa para aumentar la generación de trombina predominantemente a través de una vía dependiente de factor tisular (TF) en la que el complejo TF/FVIIa activa los factores IX y X (Hoffman y Monroe (2001) Thromb. Haemost., 85:958-965).

55 IX. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos, se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, tales como mediante mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos y sus formulaciones adecuadas se describen en, por ejemplo, Remington 's Pharmaceutical Sciences (16ª ed., Osol, A. (ed.), Mack, Easton PA (1980)). Con el fin de forma una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para una administración eficaz, dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti-factor XI, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados del mismo, solo o con una cantidad adecuada del vehículo portador.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un agente terapéutico o un compuesto que aunque es biológicamente activo no dañará la fisiología del receptor humano o animal en la medida en que la viabilidad del receptor esté comprendida.

5 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mezcladas con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tampón del pH, adyuvantes, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colores y similares, en función de la vía de administración y la preparación deseadas.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para liberación inmediata o liberación controlada. El "conjunto de absorción" representa una solución del fármaco administrado en un sitio de absorción particular y k_r , k_a y k_e son constantes de la velocidad de primer orden para: 1) la liberación del fármaco desde la formulación; 2) la absorción; y 3) la eliminación, respectivamente. Para las formas de dosificación de liberación inmediata, la constante de velocidad para la liberación del fármaco k_r es mucho mayor que la constante de la velocidad de absorción constante k_a . Para las formulaciones de liberación controlada, lo contrario es cierto, es decir $k_r \ll k_a$, de manera que la velocidad de liberación del fármaco desde la forma de dosificación es la etapa limitante de la velocidad en la liberación del fármaco en la zona objetivo. La expresión "liberación controlada", como se usa en el presente documento incluye cualquier formulación de liberación no inmediata, incluyendo, sin limitaciones, las formulaciones de liberación sostenida, de liberación retardada y de liberación pulsátil.

25 Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monoclonales anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos, se pueden administrar a dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las materias médica o veterinaria, teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y la afección del sujeto particular, y la vía de administración. La vía de administración puede ser a través de cualquier ruta que libere una dosis segura y terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados del mismo, a la sangre de un animal o ser humano. Las formas de administración incluyen, sin limitaciones, las vías de administración sistémica, tópica, enteral, y parenteral. Las vías parenterales incluyen administración oral y 30 gastrointestinal. Las vías parenterales incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica y transmucosal. Otras vías de administración incluyen la administración epidural o intratecal.

35 La dosis eficaz y la vía de administración se determinan mediante el intervalo terapéutico y la naturaleza del compuesto, y mediante factores conocidos, tales como la edad, el peso y la afección del sujeto, así como la DL_{50} y otros procedimientos de detección selectiva que son conocidos y no requieren experimentación indebida.

40 El término "dosis" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la invención, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos, administrada a un animal o ser humano. El agente terapéutico puede administrarse al receptor como un bolo o mediante liberación sostenida (continua o intermitente). Cuando la liberación de una dosis es sostenida durante un período, que puede estar en el orden de unos pocos minutos a varios días, semanas o meses, o se puede administrar por vía crónica durante un período de años, la dosis puede expresarse como el peso del agente terapéutico/kg de peso corporal del paciente tiempo/unidad de liberación.

45 Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI que cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente en necesidad del mismo. En algunas realizaciones de la invención, una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-factor XI está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. En otras realizaciones, las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo monoclonal anti-factor XI es de aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, 50 aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, u otras dosis que entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Se reconoce que el método de tratamiento puede comprender una sola administración de una dosis terapéuticamente eficaz o varias administraciones de una dosis 60 terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-factor XI.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

65 Sección experimental

Ejemplo 1. La inhibición de factor XI con el anticuerpo monoclonal 1A6 disminuye la producción de trombina

y evita la oclusión vascular en trombosis experimental en primates

El presente estudio en primates se diseñó para ayudar a aclarar el papel del FXI en la formación de trombos, y para determinar si la inhibición del FXI representa un abordaje específico de la trombosis relativamente seguro para limitar la propagación del trombo. Mediante la medición de los marcadores procoagulantes y fibrinolíticos locales, se evaluaron las mediciones dependientes del tiempo singularmente sensibles de la producción local de trombina, la activación plaquetaria y la fibrinólisis. Con el fin de delinear el papel del FXI, también se llevaron a cabo estudios utilizando un anticuerpo monoespecífico potente para el FXI. Se evaluó la deposición de plaquetas y de fibrina en los dispositivos trombogénicos y se realizaron estudios de oclusión del injerto vascular para determinar la importancia del FXI en la propagación y la estabilidad de trombos experimentales relativamente grandes bajo cizalladura de tipo arterial. Estos resultados demuestran por primera vez *in vivo* que el FXI es capaz de facilitar la sólida generación de trombina y la activación de las plaquetas en la superficie de flujo de los trombos en formación, lo que contribuye directamente al crecimiento de trombos y a su estabilidad. Estos resultados también muestran que la inhibición relacionada con el FXI de la fibrinólisis desempeña, a lo sumo, un papel menor en la limitación de la degradación de trombos de tipo arterial en propagación rápida.

Métodos

Animales experimentales. Se realizó un total de 39 estudios no terminales en 17 babuinos machos juveniles normales (*Papio anubis*) con un peso de 9-11 kg. Los experimentos se realizaron en animales despiertos no anticoagulados que tenían derivaciones arteriovenosas (AV) exteriorizadas crónicas colocadas previamente entre la arteria y la vena femoral, como se describe en otra parte (Hanson et al. (1993) J. Clin. Invest. 92:2003-2012). El flujo de sangre de la derivación basal superó los 250 ml/min en todos los animales del estudio. La ansiedad se controló con una dosis baja de ketamina (< 2 mg/kg/h). El recuento de plaquetas, el recuento de glóbulos rojos y los hematocritos se midieron diariamente, antes y después de los experimentos. La pérdida de sangre calculada no superó el 4 % del volumen total de sangre en cualquier día de experimento.

Modelo de trombosis. La formación de trombos se inició dentro de la derivación AV del babuino mediante la interposición de un segmento trombogénico de injerto vascular protésico (ePTFE, WL Gore & Co., Flagstaff, AZ), como se ha descrito previamente (Hanson et al. (1993) J. Clin. Invest. 92:2003-2012). Para desencadenar consistentemente la formación de trombos dependiente de las plaquetas, los segmentos de injertos clínicos se recubrieron con colágeno inmovilizado. Injertos de veinte mm de largo que tienen diámetros internos (d.i.) de 2 o 4 mm se cargaron con colágeno de tipo I equino (1 mg/ml; Nycomed Arzenmittel, Munich, Alemania) durante 15 minutos, y después se secaron durante la noche con un flujo de aire estéril. Este método produjo un recubrimiento de colágeno uniforme dentro del lumen del injerto, determinado mediante microscopía electrónica de barrido (Figuras 1B y 1C). Los injertos recubiertos con colágeno trombogénico se incorporaron después entre los segmentos de tubos de caucho de silicona y se desplegaron en las derivaciones AV (Figura 1A). Los injertos se expusieron a la sangre durante un máximo de 60 minutos. Durante cada experimento, el caudal de sangre a través del injerto se restringió a 100 ml/min mediante pinzamiento del segmento de derivación de caucho de silicona proximal, produciendo de este modo una velocidad de cizalladura de la pared media (MWSR) en los injertos de 4 mm de 265 s⁻¹, mientras que en los injertos de 2 mm la MWSR inicial fue de 2120 s⁻¹. Los caudales se controlaron de forma continua usando un medidor de flujo ultrasónico (Transonics Systems, Ithaca, NY). Los injertos de 4 mm no se ocluyeron y los caudales pulsátiles permanecieron a 100 ml/min hasta retirar los segmentos de injertos trombogénicos a 60 minutos. El flujo sanguíneo basal se restableció mediante la derivación permanente después de cada experimento. En los injertos de 2mm, los caudales de la sangre disminuyeron progresivamente debido a la formación de trombos. Los injertos se extrajeron de las derivaciones AV cuando el caudal disminuyó desde 100 ml/min a por debajo de 20 ml/min, de modo que señala la inminente oclusión. El tiempo desde el inicio del flujo sanguíneo a la retirada del injerto (<20 ml/min de flujo sanguíneo) se tomó como el tiempo de oclusión.

Para obtener imágenes de la deposición de plaquetas, las plaquetas autólogas de babuino se marcaron con 1 mCi de ¹¹¹In-oxina como se ha descrito previamente (Hanson et al., (1993) J. Clin. Invest. 92:2003-2012). Se infundieron las plaquetas marcadas y se dejaron circular durante al menos 1 hora antes de realizar los estudios. La acumulación de plaquetas marcadas sobre los injertos trombogénicos se midieron a intervalos de 5 minutos usando una cámara de centelleo gamma. Se infundió fibrinógeno de babuino homólogo cargado con ¹²⁵I (4 µCi, >90 % coagulable) 10 minutos antes de cada estudio y se evaluó la incorporación de la fibrina marcada dentro del trombo usando un contador gamma 30 días después de permitir la degradación de ¹¹¹In. La radiactividad depositada (cpm) se dividió por la radiactividad de la fibrina (fibrinógeno) coagulable de las muestras tomadas en el momento del estudio original (cpm/mg).

Se realizaron estudios de oclusión usando dispositivos recubiertos con colágeno de 10 mm de longitud y 2 mm de d.i. que produjeron velocidades de cizalladura arterial altas (2120 s⁻¹ a 100 ml/min pinzaron el flujo sanguíneo). La acumulación de plaquetas marcadas sobre injertos trombogénicos de 2 mm se midieron a intervalos de 3 minutos usando una cámara de centelleo gamma. El flujo se mantuvo a 100 ml/min mediante pinzado proximal durante el mayor tiempo posible y después se dejó disminuir a medida que el trombo en propagación comenzó a ocluir el dispositivo. Una velocidad del flujo de sangre final de 20 ml/min se utilizó como punto de corte para la oclusión, ya que un trombo completamente oclusivo y la falta de flujo de sangre a través del dispositivo podrían conducir a la

oclusión de la derivación y a una pérdida significativa de sangre para los animales.

Método de obtención de muestras. Se usó un nuevo método de obtención de muestras locales para evaluar la producción local de mediadores trombogénicos mediante obtención de muestras de sangre que superfundieron trombos experimentales en propagación. Dado que los marcadores de trombosis pueden degradarse y eliminarse de la circulación rápidamente, la obtención de muestras sistémicas puede carecer de la sensibilidad para detectar cambios más sutiles y no establece la localización de dicha generación de marcadores. Todas las muestras de sangre se recogieron en un 1/10^o del volumen de 3,8 % de anticoagulante citrato. Las muestras sistémicas (1 ml cada una) se recogieron antes del inicio de la trombosis, así como a los 30 y 60 minutos en cada estudio. Un total de 6 muestra de sangre local se extrajeron de IBL de sangre periférica a una velocidad de 100 µl/min en intervalos de 10 minutos de un puerto de 0,64 mm que estaba ubicado 10 mm distalmente del trombo en crecimiento (Figura 1A). Con el fin de mantener la permeabilidad del puerto de la muestra se infundió el anticoagulante de Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (PPACK, 0,5 mg/ml), que inhibe directamente la trombina, los factores FVIIa, FXa, FXIa y otras diversas serina proteasas (Angliker et al. (1988) Biochem J. 256:481–486), inmediatamente aguas arriba a una velocidad de 20 µl/min, usando también un puerto de 0,64 mm. La infusión y la obtención de muestras se regularon mediante bombas de jeringa (Harvard Apparatus). La obtención de muestras locales solo se realizó con los dispositivos de d.i. de 4 mm en este estudio. PPACK no afectó a los tiempos de protrombina (TP) sistémica o los tiempos de tromboplastina parcial activada (TTPa) que se midieron en muestras de plasma secuenciales no la obtención de muestras locales con PPACK afectó a la deposición de plaquetas o de fibrina sobre injertos recubiertos con colágeno en comparación con los resultados históricos en este modelo.

Para los estudios control se usaron tubos de extensión de caucho de silicona de longitud normal sin insertar un dispositivo trombogénico. El tubo se cortó y se volvió a unir en la misma ubicación que la inserción del injerto. Los puertos de obtención de muestras y de infusión del anticoagulante se colocaron como se ha descrito anteriormente, y las muestras de sangre se recogieron utilizando el mismo abordaje. Esto proporcionó un control de la técnica de obtención de muestras locales para determinar si este método producía la activación de las plaquetas y la vía de coagulación independiente del dispositivo trombogénico. Coherente con estudios anteriores (Savage et al. (1986) Blood 68:386–393), el tubo de silicona no era trombogénico de forma cuantificable; ni el polímero de silicona ni la técnica de obtención de muestras empleada producían una vía de coagulación significativa o activación de las plaquetas.

Análisis de la muestra de sangre. Los recuentos de células sanguíneas se determinaron usando un contador automático de células micro-60 (Horiba-ABX Diagnostics). Las muestras de sangre se dividieron en dos alícuotas y se procesaron de acuerdo con los requisitos específicos del ensayo. Todas las muestras se colocaron en hielo durante 10 minutos, se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 12.900 g, y se almacenaron los plasmas a -80 °C. Para las determinaciones de la β-tromboglobulina (βTG), las muestras se suplementaron con 4 µg/ml de prostaglandina E1 (PGE₁), 4,3 mg/ml de ácido acetilsalicílico (AAS), y 50 µg/ml de PPACK. Se usaron ensayos de ELISA de reacción cruzada para determinar los niveles del dímero D (IMUCLONE[®] D-Dimer, American Diagnostica; LOD: 35 ng/ml), el marcador de activación de plaquetas βTG (Asserachrom[®], Diagnostica Stago; LOD: 5 UI/ml) y los complejos de trombina-antitrombina (TAT, Enzygnost-TAT, Dade-Behring; LOD: 2 ng/ml). Todos los kits de ensayo ELISA utilizados para estos estudios han demostrado previamente sensibilidad a los marcadores de babuino.

Inhibición del factor XI y de las plaquetas in vivo. Dado que los estudios anteriores mostraron que los anticuerpos policlonales frente al FXI humano requerían dosis muy altas para conseguir la inhibición del FXI en babuinos (Gruber et al. (2003) Blood 102:953–955), se generó un nuevo reactivo: un potente anticuerpo monoclonal anti-FXI humano neutralizante (aXIMab) que sufrió reacción cruzada con el FXI de babuino. Se obtuvieron hibridomas de ratones Balb/c inmunizados con FXI humano purificado usando procedimientos estándar (de StGroth & Scheidegger (1980) J. Immunol. Methods 35:1–21). Los hibridomas se sometieron a detección selectiva utilizando ELISA en fase sólida contra el FXI humano, y los que mostraron unión se subclonaron dos veces mediante dilución límite. El clon que produjo el anticuerpo neutralizante más potente, que inhibía tanto la activación del FXI como la actividad del FXIa, se seleccionó sobre la base de la prolongación del tiempo de coagulación del plasma humano normal recalcificado (PHN) y el plasma de babuino normal (PBN) por el sobrenadante del cultivo celular. La línea celular productora de aXIMab (1A6) se cultivó en un biorreactor CL1000 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Integra Biosciences), y el anticuerpo se purificó a partir de los medios usando cromatografía de intercambio de cationes y de proteína A.

El FXII humano y de babuino en plasma fue reconocido por el aXIMab como una sola banda a 160 kDa en transferencias de tipo Western (Figura 7A). El anticuerpo reconoció específicamente e tercer dominio apple (A3) de la cadena pesada del FXI, tal como se evaluó mediante inmunotransferencia de quimeras recombinantes de FXI/precalicreína (véase el Ejemplo 2 a continuación; véase también Sun et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 29,023-29,028). La CI₅₀ y la CI₉₉ de aXIMab *in vitro* era de 2,5 nM y 10 nM, respectivamente, un ensayo de coagulación usando plasma humano deficiente en FXI (George King Bio-Medical) con diluciones en serie de PBN como patrones (Proctor et al. (1961) Am. J. Clin. Pathol. 36:212–219). El aXIMab (anticuerpo monoclonal 1A6) purificado se analizó dentro de un intervalo de concentración de 0–40 nM, prolongó el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) (Hemosil[™] SynthASil, Instrumentation Laboratory) de forma similar en el PHN y el PBN de un modo dependiente de la concentración sin afectar al tiempo de protrombina (Innovin[®], Dade Behring).

Inhibición farmacológica de del FXI y las actividades de las plaquetas in vivo. En un experimento piloto, se administró aXIMab (anticuerpo monoclonal 1A6; 2 mg/kg) a un solo babuino, y se recogieron las muestras de sangre en anticoagulante de citrato durante 4 semanas para medir las concentraciones del antígeno de FXI circulante (FXI: Ag), el inhibidor del FXI, y la actividad procoagulante del FXI de cada muestra. Esta dosis de aXIMab se eligió la intención de conseguir la inhibición sostenida y casi completa del FXI, suponiendo una dilución inicial del anticuerpo en 60 ml de volumen de sangre por kg de peso corporal después de la inyección. La prolongación máxima alcanzable del TTPa era de aproximadamente 2,5 veces. El FXI:Ag se midió mediante ELISA usando anticuerpos policlonales de captura y detección anti-FXI humano de cabra (conjugados con peroxidasa de rábano [HRP]) (Affinity Biologicals, Hamilton, Ontario), que también reconocieron el FXI de babuino y su complejo con aXIMab. Se construyó una curva estándar con diluciones en serie de PBN y las concentraciones de FXI se determinaron en porcentaje de PBN. Se realizaron transferencias de tipo Western para el FXI mediante fraccionamiento por tamaño de muestras de 1 µl de plasma en condiciones no reductoras sobre geles de poliacrilamida al 7,5 % - SDS, seguido de transferencia a membranas de PVDF. La detección se realizó con un anticuerpo policlonal anti-FXI humano de cabra conjugado con HRP y quimioluminiscencia. En las mismas muestras se usó el ensayo de Bethesda (Kasper et al. (1975) *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34:869–872) para determinar los niveles de actividad de inhibidor de FXI circulante (sin formar complejos) en exceso (aXIMab) y la actividad procoagulante del FXI se analizó usando un ensayo de coagulación (Proctor et al. (1961) *Am. J. Clin. Pathol.* 36:212–219).

Se administró aXIMab como un solo bolo (2 mg/kg por vía intravenosa) al menos 24 h antes de los experimentos de trombosis. El efecto anticoagulante (TTPa) se controló a diario y se realizaron experimentos de trombosis mientras que la actividad procoagulante del FXI en la sangre circulante se redujo en ≥ 99 %, evaluada mediante la comparación de los tiempos de coagulación con una curva estándar generada con plasma humano deficiente en FXI (George King Bio-Médico). El TP también se evaluó en todos los babuinos y no se observaron diferencias entre los grupos.

Los inventores han demostrado previamente que la inhibición del FXI por los anticuerpos policlonales es más segura y tan eficaz que una dosis alta de heparina en babuinos (Gruber & Hanson (2003) *Blood* 102:953–955). Dado que la aspirina es un agente menos antihemostático que la heparina y a menudo está incluida en el tratamiento estándar de la trombosis de tipo arterial dependiente de las plaquetas, se usó AAS en los estudios actuales con injertos de d-i. de 2 mm susceptibles de oclusión como control positivo de acción prolongada. Se administró AAS (32 mg/kg) por vía oral 2-4 horas antes de cada experimento de trombosis, como se ha descrito previamente (Hanson et al. (1985) *J. Clin. Invest.* 75:1591-1599). Se dejaron cuatro semanas para el lavado de cada uno de aXIMab y AAS antes de realizar nuevos experimentos en el mismo animal.

Evaluación de la hemostasia. Los efectos de la inhibición del FXI y la aspirina sobre la hemostasia primaria en babuinos se evaluaron utilizando la prueba del tiempo de hemorragia en plantilla estándar (Surgicut®; International Technidyne Corp). Experimentalmente, se ha demostrado que esta y pruebas similares (por ejemplo, los tiempos de hemorragia Simplate) son sensibles a los efectos de los anticoagulantes terapéuticos, agentes antiplaquetarios, y anomalías de la coagulación en seres humanos y primates no humanos (Gruber et al. (2007) *Blood* 109:3733–3740; Smith et al. (1985) *Am. J. Clin. Pathol.* 83:211–215; Payne et al. (2002) *J. Vasc. Surg.* 35:1204–1209). Todas las mediciones del tiempo de hemorragia las realizó el mismo técnico experto. Para la evaluación indirecta de la hemostasia, también se llevaron a cabo mediciones del TTPa y el TP.

Modelo computacional. Se usó un modelo de dinámica de fluidos computacional en 3D, similar al presentado por Xu et al. ((2004) *Biorheology* 41:113–125), para estimar las concentraciones de macromoléculas derivadas de trombos en la sangre que fluye sobre la formación de trombos y transporta los marcadores a lo largo de la pared del vaso adyacente distalmente. El modelo se basó en la geometría mostrada en la figura 1A, con valores típicos para la densidad y la viscosidad de la sangre (Fung (1993) "Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues" (2ª ed.). New York: Springer-Verlag). El modelo de obtención de muestras de sangre locales se implementó usando el software de elementos finitos ADINA (Watertown, MA). Además, se usó un modelo computacional 2D axisymmetric, similar al de Markou et al., ((1998) *Annals Biomed. Engineering* 26:502–511), para estimar la distribución del marcador de trombosis dentro del campo de flujo. El modelo computacional predijo que las moléculas de interés (β TG, dímero D de fibrina y TAT) liberadas o generadas en los lugares de formación del trombo se concentrarían (>99 %) dentro de una capa de límites de sangre periférica muy fina ($\sim 0,1$ mm de espesor de la capa de límites de la concentración) junto con la pared del vaso inmediatamente distal (datos no mostrados). Por lo tanto, tal como se emplea en el presente documento, el método de obtención de muestras locales obtuvo muestras con eficacia de la región de la capa límite de concentración cerca de la pared, inmediatamente distal al trombo en formación, para los marcadores de plaquetas y de la coagulación de interés

Estudios de coagulación en la cámara de flujo. Los tubos capilares de vidrio se recubrieron con 100 µg/ml de colágeno de Horm (Nycomed Arzenmittel, Munich, Alemania). Se extrajo sangre humana entera en inhibidor de la tripsina de maíz (ITM, 40 µg/ml), desechando el primer ml para limitar cualquier activación de la vía de coagulación y después se perfundió a través de los tubos a una velocidad de cizalladura de 265 s⁻¹ durante 10 minutos. Antes de cada experimento, la sangre se incubó con aXIMab (20 µg/ml), o vehículo de PBS. En experimentos separados, se lavaron las plaquetas y los glóbulos rojos se procesaron como se ha descrito (McCarty et al. (2006) *J. Thromb. Haemost.* 4:1367–1378), y, a continuación, se mezclaron con plasma humano deficiente en FXII (<1 % DE FXII,

Haematologic Technologies, Essex Junction, VT) para alcanzar un hematocrito del 40 % y el recuento de plaquetas de $300 \times 10^3/\mu\text{l}$. La sangre reconstituida se incubó con aXIMab (20 $\mu\text{g/ml}$) o ITM (40 $\mu\text{g/ml}$), se recalcificó con CaCl_2 7,5 mM y MgCl_2 3,75mM y después se perfundió inmediatamente a través de tubos capilares recubiertos de colágeno. El plasma humano deficiente en FXI recalcificado sin glóbulos rojos ni plaquetas también se perfundió sobre colágeno. Se obtuvieron imágenes mediante microscopia DIC después de tres minutos de perfusión con tampón de Tyrodes modificado.

Análisis de los datos. Los valores medios se proporcionan ± 1 SEM (error estándar de la media). Los datos de oclusión se compararon mediante la prueba del orden logarítmico. Se utilizó la prueba t de Student de dos colas para todas las demás comparaciones por pares individuales. Un valor de $P \leq 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

La inhibición del FXI por aXIMcab in vitro impide la formación de fibrina independiente del FXIIa. Cuando la sangre humana total, que se anticoaguló con ITM para bloquear la función del FXIIa, se perfundió sobre colágeno a una cizalladura arterial (265 s^{-1}), las plaquetas se depositaron en grandes agregados que se envolvieron formando hebras de fibrina (Figura 7B). En marcado contraste, cuando la sangre de ITM se trató con aXIMab para inhibir el FXI, la deposición de fibrina se atenuó notablemente con una modesta reducción en la adherencia de plaquetas. El resultado fue similar cuando se usó sangre deficiente en FXII reconstituido, con o sin ITM. De nuevo se generó fibrina independiente de FXII y la inhibición de FXI con aXIMab interrumpió la formación de fibrina. No se formó fibrina cuando el plasma humano deficiente en FXII recalcificado se perfundió sobre colágeno. Para estos experimentos, la sangre entera humana, anticoagulada con ITM (40 $\mu\text{g/ml}$) para inhibir el FXIIa, o sangre humana deficiente en FXII reconstituida se perfundió a través de tubos capilares recubiertos con colágeno a una velocidad de cizalladura de 265 s^{-1} durante 10 minutos. Antes de cada experimento, la sangre se incubó con aXIMab (20 $\mu\text{g/ml}$), ITM (40 $\mu\text{g/ml}$), para la sangre reconstituida cuando se indicó, o vehículo PBS. Se obtuvieron imágenes mediante microscopia de contraste de interferencia diferencial (DIC) de Kohler–illuminated Nomarski con un microscopio Zeiss Axiovert 200M usando un aceite de inmersión Zeiss 63x con una lente 1,40 NA plan–apochromat. Las imágenes se capturaron después de tres minutos de perfusión con tampón de Tyrodes modificado utilizando un Zeiss AxioCam con Slidebook 4,0 (innovaciones de imagen inteligente, Inc., Denver, CO, EE.UU.). Todos los experimentos se realizaron a 37°C . Cada imagen de la Figura 7B es representativa de 2-3 experimentos.

Estos datos sugieren que bajo una cizalladura fisiológicamente relevante, el FXI estimula la formación de fibrina independiente de FXIIa en presencia de componentes celulares de la sangre.

Inhibición del FXI con aXIMab. Se realizó un seguimiento de un babuino al que se administró aXIMab (1A6; 2 mg/kg) durante 4 semanas después de la inyección para evaluar el antígeno de FXI (FXI:Ag), la actividad anticoagulante y los niveles del inhibidor de anticuerpos. Los niveles de FXI:Ag medidos 1 hora después de la administración de aXIMab habían disminuido de 110 % to 40 % de los niveles del PBN, pero aumentaron después de forma constante, alcanzando un 300 % de control a los 8 días de la infusión (Figura 8A). El antígeno del FXI en plasma permaneció por encima de 200 % del control hasta el día 15, tras lo cual se produjo una disminución a 130 % el día 27. La actividad de FXI disminuyó de 125 % a $<1\%$ 1 h después de la administración de aXIMab y permaneció inhibidor en un $>99\%$ durante 10 días después de la administración. La actividad de FXI subió lentamente después y se normalizó a un 136 % el día 27. Los niveles del inhibidor de FXI circulante máximos se observaron 1 hora después de la infusión de aXIMab (72 unidades Bethesda [UB]), que disminuyeron a $<0,6$ el día 15 (Figura 8B). Coherente con los datos del ELISA de FXI:Ag, la banda de 160 kDa que representa el homodímero de FXI en SDS-PAGE y las transferencias Western de plasma aumentaron de intensidad entre el día 0 y el día 8 (Figura 8C). Estos resultados indican que el efecto anticoagulante de aXIMab se debía a su presencia sostenida en la circulación, y su capacidad para bloquear la activación y/o la actividad de de FXI, y no al aclaramiento de la enzima del plasma. Dado que aXIMab se separa del FXI durante la electroforesis en gel de SDS, no queda claro si la inhibición del FXI por aXIMab causaba un efecto de rebote (aumento en la secreción de FXI) o si los complejos inmunes FXI-aXIMab se eliminaban lentamente de la circulación.

Se administró a 4 babuinos inyecciones en un solo bolo i.v. de aXIMab (2 mg/kg). La actividad procoagulante del FXI se inhibió en un 99,0 % (98,8-99,5 %) 1 hora después de la infusión y permaneció inhibido $> 95\%$ en todos los animales durante 8 días después de la administración (Figura 2). No se observaron reacciones adversas al anticuerpo. Las mediciones de TTPa se prolongaron después de la administración de aXIMab a $65,6 \pm 2,0$ segundos en comparación con $30,5 \pm 0,7$ segundos en los animales control, mientras que las mediciones de TP eran equivalentes a los valores control de tratamiento con vehículo PBS en los mismos animales ($9,1 \pm 0,1$ frente a $9,0 \pm 0,1$ s, respectivamente, $n = 11$ para cada tratamiento). La agregación de plaquetas en plasma rico en plaquetas en respuesta a difosfato de adenosina (ADP) y el colágeno se mantuvo sin cambios para los animales tratados con aXIMab frente a los resultados del control.

Los babuinos tratados con aXIMab están protegidos del desarrollo de trombos iniciados con colágeno. Los estudios anteriores han demostrado que la inhibición del FXI por un anticuerpo policlonal era antitrombótica sobre el factor tisular y las superficies de inicio de contacto en primates (Gruber & Hanson (2003) Blood. 102:953–955). Dado que la lesión vascular también puede exponer grandes cantidades de colágeno reactivo de plaquetas al flujo de sangre,

se estudió el efecto de la inhibición del FXI sobre trombosis iniciada con colágeno en los babuinos. Se observaron diferencias significativas en la acumulación de plaquetas entre los grupos tratados con aXIMab y con vehículo ya 10 minutos después de la exposición del injerto al flujo de sangre ($0,13 \pm 0,03 \times 10^9$ frente a $0,23 \pm 0,03 \times 10^9$ plaquetas, aXIMab frente al control, $P < 0,05$). Las diferencias siguieron siendo estadísticamente significativas a lo largo del curso del tiempo de la propagación del trombo (Figura 3A). La acumulación de plaquetas en el injerto a los 60 minutos fue un 63 % menor en los animales tratados con aXIMab que en los vehículos control ($1,38 \pm 0,26 \times 10^9$ frente a $3,68 \pm 0,52 \times 10^9$ plaquetas, aXIMab frente al control, $n = 6$ y 8 , respectivamente, $P < 0,01$; Figura 3A). Los recuentos de plaquetas sistémicas antes de los estudios de trombosis fueron similares para ambos grupos de control y aXIMab ($341 \pm 27 \times 10^3/\mu\text{l}$ frente a $337 \pm 31 \times 10^3/\mu\text{l}$, respectivamente), y no cambiaron significativamente después de los experimentos de trombosis. La deposición terminal de fibrina se redujo en un 81 % en comparación con los controles ($0,23 \pm 0,07$ mg y $1,18 \pm 0,19$ mg, aXIMab frente al control, $P = 0,001$; Figura 3B). Dado que aXIMab es mono-específico para el dominio A3 del FXI, estos datos verifican que FXI desempeña un papel importante en la propagación del trombo en condiciones de flujo de tipo arterial en primates.

15 *Generación reducida de trombina y activación de plaquetas durante la inhibición del FXI.* Dado que la inhibición del FXI podría reducir la formación de trombos *in vivo* limitando tanto la activación de las plaquetas como la formación de fibrina mediadas por trombina y/o mediante el aumento de la trombolisis, se midieron los niveles de βTG , trombina (TAT) y de Dímero D. Los niveles sistémicos previos al tratamiento de βTG , TAT, y Dímero D fueron comparables en babuinos tratados con vehículo y con aXIMab ($19,3 \pm 2,6$ frente a $24,8 \pm 3,8$ UI/ml, $6,2 \pm 0,4$ frente a $4,6 \pm 0,6$ $\mu\text{g/l}$, y $2,3 \pm 0,2$ frente a $2,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Sorprendentemente, se observó un fuerte incremento > 20 veces en la liberación de TAT en la circulación sanguínea desde el área de trombos del injerto, medido en muestras tomadas a nivel local de la región cercana a la pared, inmediatamente aguas abajo de la formación del trombo en los babuinos tratados con vehículo. El pre-tratamiento de babuinos con aXIMab impidió el aumento de los niveles de TAT locales, lo que indica una reducción considerable de la generación de trombina en ausencia de actividad de FXI (Figura 4A). Los niveles de TAT en plasmas obtenidos mediante obtención de muestras locales se redujeron hasta en un 98 % a los 40 minutos, mientras que los niveles sistémicos de TAT se redujeron en un 81 % a los 60 minutos frente a los controles no tratados ($4,3 \pm 0,5$ frente a $22,1 \pm 2,5$ $\mu\text{g/l}$, $n = 6$ y 7 , respectivamente, $P < 0,001$; Figura 4B). La activación de las plaquetas en la superficie del trombo, evaluada mediante la liberación de α -gránulos de βTG de plaquetas, se redujo en un 86 % a los 30 minutos en muestras tomadas distalmente de los trombos en los animales tratados con aXIMab (Figura 4C). Los niveles sistémicos de βTG medidos a los 60 minutos se redujeron en un 42 % mediante aXIMab ($23,0 \pm 2,1$ UI/ml, $n = 6$) en comparación con los controles tratados con vehículo ($39,5 \pm 5,5$ UI/ml, $n = 7$; Figura 4D, $P < 0,05$). Los niveles locales del Dímero D no cambiaron a los 60 minutos en comparación con los valores sistémicos basales en animales control ($2,3 \pm 0,2$ y $2,4 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, $n = 7$) o animales tratados con aXIMab ($2,4 \pm 0,2$ y $2,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, $n = 6$; Figura 4E). Los niveles sistémicos de dímero-D evaluados a los 60 minutos también se mantuvieron sin cambios respecto a los valores sistémicos basales en ambos grupos ($2,4 \pm 0,3$ y $2,3 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$, animales control frente a animales tratados con aXIMab). Esto confirma informes previos de estudios de babuinos similares que muestran que los niveles sistémicos de Dímero D no aumentan a los 60 min después del inicio del trombo, a menos que se administre un agente trombolítico (Sundell et al. (1997) *Circulation* 96:941–948; Dichek et al. (1996) *Circulation* 93:301-309).

Con el fin de evaluar el método de obtención de muestras locales para la activación de la coagulación y las plaquetas, el sistema se probó sin la interposición de un dispositivo trombogénico recubierto de colágeno dentro del bucle de derivación. Aunque el tubo solo aumentó modestamente los niveles de TAT y β -TG sistémica y localmente (Figura 4A–C), las elevaciones no fueron estadísticamente significativas. No se midió formación de fibrina ni deposición de plaquetas en el tubo control.

Estos datos indican que: 1) FXI desempeña un papel importante en la generación de trombina y la activación de plaquetas durante la formación de trombos de tipo arterial agudos y 2) la trombolisis local endógena parece estar limitada durante el curso de tiempo de estos estudios, con independencia de f

Actividad del FXI.

aXIMab impide la oclusión del injerto vascular. A pesar de que los trombos macroscópicos se formaron rápidamente en los injertos vasculares de 4 mm de d.i., ninguno de estos injertos se ocluyeron durante 60 minutos de perfusión de la sangre. Los efectos de la inhibición de la actividad del FXI sobre la formación de trombos y la oclusión se evaluaron usando injertos vasculares recubiertos con colágeno de menor diámetro (d.i. 2 mm) que acumularon trombos en condiciones de cizalladura más altas (velocidad de cizalladura de la pared = 2120 s^{-1}). Mientras que la velocidad inicial de acumulación de plaquetas fue similar en los babuinos tratados con aXIMab y tratados con vehículo, la estabilidad de los trombos se redujo profundamente en la ausencia de actividad del FXI. En 12 a 15 minutos después del inicio de la perfusión de sangre, la velocidad del crecimiento del trombo de plaquetas se redujo en todos los animales tratados con aXIMab, y el número de plaquetas en el trombo disminuyó bruscamente, lo que indica una estabilidad reducida de los trombos y una pérdida neta del material de trombos para embolización (Figura 5). El tratamiento con aXIMab impidió la oclusión del injerto durante 60 minutos en todos los experimentos (5 de 5 injertos permanecieron permeables), en comparación con los resultados en los controles tratados con vehículo en los que 8 de 9 injertos se ocluyeron en $27,0 \pm 3,3$ min ($P < 0,01$; Figura 5 y Tabla 1). La acumulación de fibrina

también se redujo mediante el tratamiento con aXIMab frente a los controles tratados con vehículo ($0,18 \pm 0,02$ frente a $0,30 \pm 0,04$ mg, respectivamente, $P < 0,01$; Tabla 1). Como era de esperar, el tratamiento con el control antitrombótico positivo, dosis altas de AAS, redujo la deposición de plaquetas en los injertos de d.i. de 2 mm, pero no interrumpió completamente la formación de trombos oclusivos. El tiempo hasta la oclusión del injerto lo prolongó la aspirina en un promedio de 18 minutos en 4 injertos, mientras que 2 injertos adicionales permanecieron permeables en todo el intervalo de estudio de 60 minutos. Por tanto, las dosis altas de de AAS fueron menos eficaces en la prevención de la oclusión del injerto que aXIMab ($P < 0,05$, aXIMab frente a AAS). Estos datos indican que EL FXI desempeña un papel importante en el proceso trombogénico que conduce a la oclusión aguda de los injertos vasculares de pequeño calibre.

Tabla 1. La inhibición del FXI por aXIMab impide la oclusión del injerto vascular en babuinos.

	Número de ocluidos	Acontecimientos embólicos por experimento	Deposición de fibrina (mg)
Control	8/9	n.d.	$0,30 \pm 0,04$
AAS	4/6	$1,5 \pm 0,6$	$0,23 \pm 0,04$
aXIMab	0/5	$6,6 \pm 0,9$	$0,18 \pm 0,02^*$

Los datos mostrados son valores absolutos o medias \pm SEM cuando sea aplicable. FXI, factor XI; aXIMab, anticuerpo monoclonal anti-FXI; AAS, aspirina; n.d., no detectado. * $P < 0,01$ en comparación con el control utilizando la prueba t de Student de dos colas.

Ausencia de efectos antihemostáticos de la inhibición del FXI con aXIMab. Dado que todos los fármacos anticoagulantes y antiplaquetarios aprobados por la FDA producen efectos antihemostáticos no deseados, una nueva terapia específica para la trombosis podría proporcionar una alternativa segura para los pacientes con alto riesgo de sangrado. La hemorragia en la plantilla se prolonga por acción de los agentes antiplaquetarios y los anticoagulantes en babuinos (Gruber et al. (2007) Blood 109:3733–3740; Hanson et al. (1988) J. Clin. Invest. 81:149–158), aunque la inhibición del FXI por aXIMab no tuvo ningún efecto sobre el tiempo de hemorragia en plantilla estándar en comparación con los controles tratados con vehículo ($3,5 \pm 0,3$ frente a $3,4 \pm 0,2$ min, $n = 18$ y 14 , respectivamente). Por comparación, el pretratamiento con una sola dosis de AAS casi duplicó el tiempo de hemorragia a $6,4 \pm 0,7$ min ($n = 10$, $P < 0,01$). No se observaron fenómenos de repetición de las hemorragias, petequias, hematomas u otros acontecimientos hemorrágicos adversos en ninguno de los animales tratados con aXIMab o AAS durante periodos de seguimiento de observación de una semana. En conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de la actividad de FXI por un anticuerpo monoclonal neutralizante reduce más eficazmente la propagación de trombos oclusivos agudos de tipo arterial, con menos efecto sobre la hemostasia primaria, que una dosis antihemostática de aspirina en babuinos.

Discusión

Estos estudios demuestran que el FXI es crucial para la producción facilitada de cantidades sólidas de trombina en la superficie de flujo de los trombos iniciados por colágeno y en propagación, lo que conduce a la activación de plaquetas, la formación de fibrina, y la estabilidad de trombos en condiciones de flujo arterial alto y bajo. El resultado antitrombótico/antioclusivo de la inhibición del FXI se produjo principalmente a través de una disminución sustancial de la producción de trombina en lugar de a través de un aumento en las vías fibrinolíticas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, dado que la trombina es el agonista fisiológico de las plaquetas más potente, es probable que la disminución significativa de la activación de las plaquetas observada durante la inhibición de FXI dio como resultado la regulación por disminución de la generación de trombina. Mientras que la inhibición del FXI retrasó la deposición de plaquetas sobre colágeno en condiciones de un flujo arterial bajo, el crecimiento temprano del trombo a un flujo alto reflejó el de los estudios de control. Estos resultados son coherentes con la mayor eficiencia de plaquetas GPIIb que se unen a vWF sobre colágeno expuestos a cizalladura alta (Nishiya et al. (2002) Blood. 100:136–142), que produce menos dependencia de la fibrina para el crecimiento temprano de trombos que en condiciones de cizalladura baja. En la fase de propagación del crecimiento de los trombos, la estabilidad de los trombos expuestos a un flujo de cizalladura alta fue dependiente en gran medida de FXI y su capacidad para facilitar la producción de fibrina y la activación de plaquetas. De hecho, bajo un flujo arterial alto, se observó claramente tromboembolización distal potenciada, que impidió completamente la oclusión de los injertos vasculares en todos los animales tratados con aXIMab. Estos hallazgos son consistentes con el fenotipo antitrombótico y antioclusivo observado en ratones deficientes en FXI tras una lesión arterial y trombosis inducidas por cloruro térmico (Rosen et al. (2002) Thromb. Haemost. 87:774–776; Wang et al. (2005) J. Thromb. Haemost. 3:695–702; Wang et al. J. Thromb. Haemost. 4:1982–1988). No obstante, ninguno de los estudios previos *in vivo* de trombogénesis dependiente de flujo ha proporcionado pruebas del mecanismo antitrombótico subyacente de la inhibición del FXI.

El FXI estimula la resistencia de los coágulos a la fibrinólisis a través de activación mediada por trombina de la metaloproteinasas TAFI, que modifica proteolíticamente la fibrina convirtiéndola en resistente a la plasmina (Bajzar et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:16.603–16.608; Broze y Higuchi (1996) Blood 88:3815–3823). Además, la inhibición de la generación de trombina por los anticoagulantes potencia la lisis de los coágulos debido a una red de fibrina menos densa de formación más lenta (Gruber et al. (1994) Blood 83:2541–2548; Nenci et al. (1992) Blood Coagul. Fibrinolysis 3:279–285). Ambos procesos pueden representar, al menos en parte, la lisis potenciada de coágulos de sangre formados en presencia de un anticuerpo anti-factor XI anticoagulante en la vena yugular pinzada de conejos (Minnema et al. (1988) J. Clin. Invest. 101:10-14). Durante los estudios actuales en babuinos, el producto de

degradación fibrinolítica de Dímero D se midió mediante toma de muestras de sangre local en las proximidades de la fibrina, plaquetas y trombos de tipo arterial ricos en leucocitos (Gruber et al. (2007) Blood 109:3733–3740). A diferencia de los niveles de TAT y β TG, no se detectaron cambios en el dímero D local para los babuinos tratados con vehículo o con aXIMab. Este hallazgo sugiere que la fibrinólisis endógena puede no ser un proceso dominante en la superficie de los trombos durante la trombogénesis arterial aguda, que es consistente con la observación de que los ratones deficientes en TAFI que se esperaba que tuvieran un fenotipo fibrinolítico no estaban protegidos contra la formación de trombos arteriales inducidos por la lesión (Nagashima et al. (2002) J. Clin. Invest. 109:101-110). Aunque el presente estudio no demostró un papel para la fibrinólisis en el desarrollo rápido de trombos, la fibrinólisis endógena más eficaz en la ausencia de actividad de FXI puede desempeñar un papel en las etapas posteriores del desarrollo y reorganización de trombos.

La reducción dramática del TAT local durante la inhibición del FXI con aXIMab ilustra la importancia del FXI en la producción de trombina en la superficie de los trombos en propagación iniciados por colágeno, que contribuye directamente a la formación de fibrina, la activación de plaquetas y la estabilidad de los trombos.

Dado que no se puede detectar PPACK-trombina en el inmunoensayo enzimático descrito anteriormente, todo el TAT local se generó en la superficie de flujo de los trombos o dentro de una distancia de ~ 1 cm desde el trombo al puerto de infusión de PPACK (menos la contribución sistémica). Un beneficio del uso de PPACK sobre otros anticoagulantes es su capacidad para inhibir rápidamente un número de serina proteasas activas de la vía de coagulación, incluyendo el factor Xa, que, como parte del complejo de protrombinasa en las plaquetas activadas se pueden proteger de otros anticoagulantes y continúan generando trombina. PPACK también puede inhibir el FXIa y limitar la activación por contacto no deseado dentro de la jeringa de obtención de muestras durante los intervalos de obtención de muestras de 10 minutos. Sin infusión de PPACK, el puerto de obtención de muestras locales se ocluyó en 20-30 minutos. Sobre la base de los modelos de CFD empleados, la mayoría del PPACK infundido se capturó dentro de la jeringa de obtención de muestras. La pequeña cantidad de PPACK que escapó a la circulación sistémica no afectó a la deposición de plaquetas o de fibrina sobre los injertos recubiertos de colágeno de 4 mm en comparación con los datos históricos. Además, el PPACK infundido total, si se administra sistémicamente, es un orden de magnitud menor que el que previamente se ha demostrado que prolonga los tiempos de coagulación en babuinos (Hanson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:3184–188).

La disminución de los niveles locales de TAT y β -TG cercanos a los 60 minutos en los estudios sin tratamiento con colágeno se correlacionó con una disminución de la tasa de acumulación de plaquetas. No se sabe lo que llevó a la pacificación del crecimiento de los trombos y la producción de mediadores, pero, posiblemente, es el resultado de la generación de proteína C activada (APC) o la producción de otros inhibidores de la coagulación.

Otro resultado interesante de estos experimentos sugiere que el factor tisular (TF) circulante, ya sea a través de las plaquetas o micropartículas, no parece desempeñar un papel importante en la estimulación del desarrollo de trombos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la formación del complejo TF/FVIIa debería soportar la producción de trombina y la formación de fibrina independiente de la vía de contacto, pero la inhibición de FXI limita significativamente la producción de fibrina sobre el colágeno. Un escenario similar es que el FXIa estimula una sólida amplificación de retroalimentación de la trombina, que estimula la formación de fibrina y la activación de plaquetas independiente del TF circulante (Gailani et al. (1991) Science. 253:909–912; Broze et al. (1993) Thromb. Haemost. 70:72-74; Wang et al. (2001) Blood. 97:3117–3122; Yun et al. (2003) J. Biol. Chem. 48:48112–48119; Baglia et al. (2004) J. Biol. Chem. 279: 49323-49329).

La activación del FXI por el factor XIIa también puede ser un proceso importante durante el desarrollo de trombos iniciado por colágeno.

La disminución de la formación de TAT local durante la inhibición del FXI en babuinos, combinada con una acumulación más limitada de plaquetas y de fibrina, ilustra la importancia de una generación de trombina dependiente de FXI en la propagación de trombos. La generación de trombina dependiente de FXI podría producirse mediante activación continua del FXI por FXIIa, trombina, y/o autoactivación (Gailani & Broze (1991) Science 253:909–912; Broze & Gailani (1993) Throb. Haemost. 70:72–74). Parece que el FXII desempeña un papel importante de la trombosis experimental en ratones (Renne et al. (2005) J. Exp. Med. 202:271–281). Sin embargo, los datos actuales *in vitro* de la cámara de flujo presentan un mecanismo de modo que el FXI estimule la trombosis independiente de FXIIa durante condiciones de flujo de cizalladura en presencia de células sanguíneas. Aunque se ha cuestionado la activación de FXI mediada por trombina en ensayos estáticos de plasma *in vitro* (Pedicord et al. (2007) PNAS USA 104:12.855–12.860), el modelo de trombosis aumentada por flujo de los inventores demuestra claramente una vía trombogénica independiente de FXII para FXI.

Curiosamente, mientras el FXI: Ag libre se redujo a <1 % durante más de una semana después de la inyección de aXIMab, los niveles totales de de FXI: Ag aumentaron temporalmente varias veces por encima del valor basal después de la desaparición de la actividad del FXI en la circulación de babuinos. Queda por determinar si este aumento se debía a una semivida más larga de los complejos inmunes circulantes o a la regulación por aumento de la síntesis y/o secreción de FXI.

El papel evolutivo del FXI ha sido difícil de dilucidar plenamente, pero estos y otros estudios apoyan una hipótesis de que el FXI funciona, en parte, para estimular la hemostasia después de la lesión transvascular, que puede exponer grandes cantidades de colágeno al flujo. En ausencia de FXI, puede que los trombos oclusivos prohemostáticos no se estabilicen, lo que conduce a una pérdida de sangre incrementada y potencialmente mortal. Dado que los procesos hemostáticos dependientes del factor tisular dominan durante la mayoría de los acontecimientos hemorrágicos, es probable que el FXI desempeñe un papel únicamente tras cirugía i traumatismo, que son las manifestaciones clínicas dominantes de la deficiencia de FXI grave en pacientes humanos. Además, dado que el FXI parece tener su efecto central sobre la superficie de flujo del trombo en propagación y los pacientes con deficiencia de FXI tienen una tendencia a la hemorragia generalmente leve, el FXI parece ser una estrategia de tratamiento más específica de la trombosis que otros métodos antitrombóticos existentes, que pueden producir graves episodios hemorrágicos independientes de un traumatismo o cirugía importantes.

En general, las pruebas presentadas anteriormente muestran que el FXI es crucial para la propagación del trombo inducido por colágeno mediante la estimulación de un incremento local considerable de la producción de trombina que, a su vez, contribuya a una fuerte activación de plaquetas y formación de fibrina. No obstante, la inhibición del FXI no interfiere sustancialmente con la hemostasia primaria. Por tanto, la inhibición terapéutica del FXI representa una estrategia de tratamiento excepcionalmente prometedora para limitar el crecimiento de trombos y la oclusión de vasos trombóticos (es decir, ictus, ataque cardiaco, TVP), mientras, al mismo tiempo, proporcionan una seguridad quimiostática inigualable en comparación con otros agentes antitrombóticos disponibles en la actualidad.

Ejemplo 2. Unión del anticuerpo monoclonal 1A6 frente al factor XI humano

Los resultados de un estudio de transferencia tipo Western que corroboran que el anticuerpo monoclonal anti-factor XI 1A6 reconoce el factor XI en plasma de ser humano y de primate no humano se muestran en la figura 7A.

Se realizaron estudios de unión comparativos para el anticuerpo monoclonal 1A6 usando FXI, precalicreína (PK) y quimeras de FXI/PK, que implican la sustitución de dominios de FXI por dominios de PK (figura 9) o la sustitución de dominios de PK por dominios de FXI (figura 10). Como se muestra en el panel derecho de la figura 9, el anticuerpo monoclonal 1A6 se unió a FXI unido, pero no se unió a PK. Además, el anticuerpo monoclonal 1A6 se unió a todas las quimeras FXI/PK excepto a la quimera en la que el dominio A3 de FXI se había sustituido por un dominio de PK (Figura 9). Para las quimeras que implican la sustitución de dominios de PK por dominios de FXI diferentes, se demostró que el anticuerpo 1A6 se unía únicamente a las quimeras en el que se había insertado el dominio A3 de FXI (figura 10). A partir de estos estudios de la pérdida de la función (figura 9) y la ganancia de función (figura 10) se determinó que el anticuerpo monoclonal 1A6 se unía a un epítipo sobre el dominio A3 de FXI.

También se llevaron a cabo estudios de unión usando proteínas recombinantes del FXI que implican mutaciones de diferentes aminoácidos dentro del dominio A3 para determinar los aminoácidos importantes para la unión del anticuerpo monoclonal 1A6. Un ejemplo de la unión del anticuerpo monoclonal 1A6 a un panel de 25 de tales proteínas recombinantes en las que 2 o 3 aminoácidos adyacentes dentro del dominio A3 se habían sustituido por alanina se muestra en la figura 11. Aunque un anticuerpo policlonal anti-factor XI se unía a todos los mutantes del dominio A3 del FXI, el anticuerpo monoclonal 1A6 no se unió a algunos mutantes (véase la figura 11). Según estos estudios se determinaron los aminoácidos importantes para la unión del anticuerpo monoclonal 1A6 al dominio A3 del FXI A3 y se muestran en la Figura 12 (aminoácidos 183 to 197, 203 a 204, 234 a 236, 241 a 243, 252 a 254 y 258 a 260 de la SEQ ID NO:1).

Ejemplo 3. Secuenciación del anticuerpo monoclonal 1A6 y secuencia de codificación

Se extrajo ARNm de una línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo murino conocido como Aximab (1A6), se realizó transcripción inversa y los transcritos específicos del anticuerpo se amplificaron mediante PCR. Los productos de PCR se clonaron para la determinación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de este anticuerpo.

La línea celular se recuperó con éxito de reservas congeladas. El ARNm se extrajo del sedimento celular del hibridoma y se realizó RT/PCR utilizando un sistema de grupos de cebadores degenerados. El ARNm de la región variable de la cadena pesada se amplificó utilizando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerados (HA a HF) y el ARNm de la región variable de la cadena ligera se amplificó utilizando un conjunto de ocho grupos de cebadores degenerados (LA a LH).

Cadena pesada de Aximab: En el grupo de cebadores HD se observó una fuerte banda de ADN sólida de aproximadamente el tamaño esperado. El ADN de esta banda se purificó y se clonó, y se secuenciaron ocho clones. Cuatro de estos clones se alinearon para dar una cadena pesada reordenada funcional (Tabla 2, Figura 13 A).

Tabla 2. Análisis de la secuencia del anticuerpo Aximab (1A6) (definiciones y numeración de la secuencia de CDR conforme a Kabat).

	Cadena H	Cadena L
Longitud de CDR1	7 aa	15 aa

Longitud de CDR2	16 aa	7 aa
Longitud de CDR3	14 aa	9 aa
Línea germinal humana más cercana*	IGHV2-5 (76 %)	IGKV4-1 (70 %)
FW1 humana más cercana*	IGHV2-5 (80 %)	IGKV4-1 (83 %)
FW2 humana más cercana*	IGHV2-5 (86 %)	IGKV4-1 (100 %)
FW3 humana más cercana*	IGHV2-70 (72 %)	IGKV3-11 (78 %)
J humana más cercana*	IGHJ6 (92 %)	J4 (92 %)
N.º máximo de restos FR de ratón**	9 (2)	5 (3)

*Las ID de la línea germinal se indican seguidos del % de homología.

**Indica el número máximo de restos de ratón que tienen que obtenerse de los segmentos de la secuencia humana con el número de los potencialmente cruciales para la afinidad indicados entre paréntesis.

5 *Cadena ligera de Aximab:* En los grupos de cebadores LB, LC y LG se observaron fuertes bandas de ADN del tamaño esperado. El ADN de cada banda se purificó y se clonó, y se secuenciaron cuatro clones de cada banda. Se descubrió que los ocho clones de los grupos LB y LC se alineaban con el transcrito kappa aberrante bien descrito hallado en algunos hibridomas. Los cuatro clones del conjunto LG se alinearon para dar una cadena ligera reordenada funcional (Tabla 2, Figura 13B).

10 Se determinaron las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera del hibridoma Aximab. Se confirmó que Aximab es un anticuerpo IgG/kappa murino y que ambas cadenas de este anticuerpo tienen una estrecha homología de la secuencia en las bases de datos de anticuerpos humanos a través de las regiones marco (Tabla 2). Esto debería facilitar la posterior humanización mediante tecnología Composite Human Antibody™ o injerto de CDR. Se produjeron clones de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo y, por lo tanto, están disponibles para la humanización. Las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera con injerto de CDR de ejemplo se muestran en las figuras 13C y 13D.

15 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

20 Aunque la anterior invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustraciones y ejemplos para los fines de claridad de la comprensión, será obvio que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Oregon Health & Science University
Vanderbilt University
Gruber, Andras
Tucker, Erik I
Hanson, Stephen R
30 Gailani, David

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FACTOR XI Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

35 <130> 053362/364212

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1
<211> 607
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 1

ES 2 566 963 T3

Glu Cys Val Thr Gln Leu Leu Lys Asp Thr Cys Phe Glu Gly Gly Asp
 1 5 10 15
 Ile Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser Ala Lys Tyr Cys Gln Val Val Cys
 20 25 30
 Thr Tyr His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Thr Phe Thr Ala Glu Ser Pro
 35 40 45
 Ser Glu Asp Pro Thr Arg Trp Phe Thr Cys Val Leu Lys Asp Ser Val
 50 55 60
 Thr Glu Thr Leu Pro Arg Val Asn Arg Thr Ala Ala Tyr Ser Gly Tyr
 65 70 75 80
 Ser Phe Lys Gln Cys Ser His Gln Ile Ser Ala Cys Asn Lys Asp Ile
 85 90 95
 Tyr Val Asp Leu Asp Met Lys Gly Ile Asn Tyr Asn Ser Ser Val Ala
 100 105 110
 Lys Ser Ala Gln Glu Cys Gln Glu Arg Cys Thr Asp Asp Val His Cys
 115 120 125
 His Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Arg Gln Phe Pro Ser Leu Glu His Arg
 130 135 140
 Asn Ile Cys Leu Leu Lys His Thr Gln Thr Gly Thr Pro Thr Arg Ile
 145 150 155 160

ES 2 566 963 T3

Thr Lys Leu Asp Lys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys Ser Cys Ala
 165 170 175
 Leu Ser Asn Leu Ala Cys Ile Arg Asp Ile Phe Pro Asn Thr Val Phe
 180 185 190
 Ala Asp Ser Asn Ile Asp Ser Val Met Ala Pro Asp Ala Phe Val Cys
 195 200 205
 Gly Arg Ile Cys Thr His His Pro Gly Cys Leu Phe Phe Thr Phe Phe
 210 215 220
 Ser Gln Glu Trp Pro Lys Glu Ser Gln Arg Asn Leu Cys Leu Leu Lys
 225 230 235 240
 Thr Ser Glu Ser Gly Leu Pro Ser Thr Arg Ile Lys Lys Ser Lys Ala
 245 250 255
 Leu Ser Gly Phe Ser Leu Gln Ser Cys Arg His Ser Ile Pro Val Phe
 260 265 270
 Cys His Ser Ser Phe Tyr His Asp Thr Asp Phe Leu Gly Glu Glu Leu
 275 280 285
 Asp Ile Val Ala Ala Lys Ser His Glu Ala Cys Gln Lys Leu Cys Thr
 290 295 300
 Asn Ala Val Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Ala Ser
 305 310 315 320
 Cys Asn Glu Gly Lys Gly Lys Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Asn Gly
 325 330 335
 Ser Pro Thr Lys Ile Leu His Gly Arg Gly Gly Ile Ser Gly Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Arg Leu Cys Lys Met Asp Asn Glu Cys Thr Thr Lys Ile Lys Pro
 355 360 365
 Arg Ile Val Gly Gly Thr Ala Ser Val Arg Gly Glu Trp Pro Trp Gln
 370 375 380
 Val Thr Leu His Thr Thr Ser Pro Thr Gln Arg His Leu Cys Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Ile Ile Gly Asn Gln Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Tyr
 405 410 415

ES 2 566 963 T3

Gly Val Glu Ser Pro Lys Ile Leu Arg Val Tyr Ser Gly Ile Leu Asn
 420 425 430

Gln Ser Glu Ile Lys Glu Asp Thr Ser Phe Phe Gly Val Gln Glu Ile
 435 440 445

Ile Ile His Asp Gln Tyr Lys Met Ala Glu Ser Gly Tyr Asp Ile Ala
 450 455 460

Leu Leu Lys Leu Glu Thr Thr Val Asn Tyr Thr Asp Ser Gln Arg Pro
 465 470 475 480

Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Arg Asn Val Ile Tyr Thr Asp Cys
 485 490 495

Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Lys Leu Arg Asp Lys Ile Gln Asn
 500 505 510

Thr Leu Gln Lys Ala Lys Ile Pro Leu Val Thr Asn Glu Glu Cys Gln
 515 520 525

Lys Arg Tyr Arg Gly His Lys Ile Thr His Lys Met Ile Cys Ala Gly
 530 535 540

Tyr Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 545 550 555 560

Leu Ser Cys Lys His Asn Glu Val Trp His Leu Val Gly Ile Thr Ser
 565 570 575

Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Arg Glu Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn
 580 585 590

Val Val Glu Tyr Val Asp Trp Ile Leu Glu Lys Thr Gln Ala Val
 595 600 605

<210> 2
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 2

caagttactc taaaagagtc tggccctggg atattgaagc cctcacagac cctcagtcgt 60
 acttgttctt tctctggggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120
 cagccttcag ggaagggctct ggagtggtct gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180
 tataaccocat cctgaagag ccagctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggtt 240

5

10

ES 2 566 963 T3

ttcctcaaga tcaccagtgt ggacgctgca gatactgccca cttactactg tgctcgaaag 300
 aggtcttcgg ttgtagccca ttactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 360
 accgtctcct ca 372

5 <210> 3
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Lys Arg Ser Ser Val Val Ala His Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10
 15 <210> 4
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 4

ES 2 566 963 T3

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatct gaactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatgg ggatccgtgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 5

5

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

10

<210> 6
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 6

15

ES 2 566 963 T3

caagttactc taaaagagtc tggccctacc atagtgaagc ccacacagac cctcactctg 60
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120
 cagccttcag ggaaggctct ggagtggtg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180
 tataacccat ccctgaagag cgggtcaca atcaccaagg atacctcaa aaaccagggt 240
 gtcctcacca tgaccaatat ggacgctgtg gatactgccca cttactactg tgctcgaaag 300
 aggtcttcgg ttgtagccca ttactatgct atggactact ggggtcaagg aaccacagtc 360
 accgtctcct ca 372

5 <210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 7

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Ile Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr 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 Lys Arg Ser Ser Val Val Ala His Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 8
 <211> 333
 <212> ADN
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 8

ES 2 566 963 T3

```

gacattgtgc tgaccaatc tccagattct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc      60
atcacctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg atagttatct gaactggtac      120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct      180
gggatcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct      240
tctgtgcagg aggaggatgt ggcaacctat tactgtcagc aaagtaatgg ggatccgtgg      300
acgttcggtg gaggcaccaa ggtggaaatc aaa                                    333
    
```

<210> 9
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 9

5

```

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-Factor XI (FXI) purificado o un fragmento biológicamente activo del mismo que se unen específicamente al FXI humano descrito en la SEQ ID NO: 1, en donde dichos anticuerpo o fragmento biológicamente activo del mismo comprenden seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR), en donde dichas regiones CDR tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 y 15.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 3 o 7; y
 - b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 3 o 7; y/o
- en donde dicho anticuerpo comprende una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 5 o 9; y
 - b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 5 o 9.
3. Un anticuerpo o un fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para inhibir la trombosis sin comprometer la hemostasia, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una dosis eficaz del anticuerpo o del fragmento.
4. El anticuerpo o el fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha trombosis está asociada a infarto de miocardio, angina inestable, fibrilación auricular, ictus, daño renal, embolia pulmonar, trombosis venosa profunda, angioplastia coronaria transluminal percutánea, coagulación intravascular diseminada, septicemia, órganos artificiales, derivaciones o prótesis.
5. El anticuerpo o el fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el método comprende administrar el anticuerpo en combinación con un agente antitrombótico.
6. El anticuerpo o el fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho agente antitrombótico es un inhibidor directo o indirecto de la trombina, un inhibidor del factor X, un inhibidor del factor IX, un inhibidor del factor XII, un inhibidor del factor V, un inhibidor del factor VIII, un inhibidor del factor XIII, un inhibidor del factor VII, un inhibidor del factor tisular, un agente profibrinolítico, un agente fibrinolítico o fibrinogenolítico, un inhibidor de la carboxipeptidasa B, un inhibidor de plaquetas, un agente reductor selectivo del recuento de plaquetas o un inhibidor del Factor XI.
7. El anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en un método para tratar el cáncer metastásico en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o del fragmento.
8. El anticuerpo o el fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en un método para tratar una reacción inflamatoria aguda en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o del fragmento.
9. El anticuerpo o el fragmento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde dicho sujeto es humano.
10. El anticuerpo o el fragmento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde en dicho método, dichos anticuerpo o fragmento se administran a dicho sujeto:
- (i) en una dosis única de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg; o
 - (ii) in en una dosis única de 2 mg/kg.
11. El anticuerpo o el fragmento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde en dicho método, dichos anticuerpo o fragmento se administran a dicho sujeto mediante administración sistémica, tópica, parenteral o enteral.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y en donde la composición farmacéutica se formula opcionalmente para:

- (i) la liberación inmediata de dichos anticuerpo o fragmento; o
- (ii) la liberación controlada de dichos anticuerpo o fragmento.

5 13. Un polinucleótido aislado, en donde dicho polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende:

(i) una cadena pesada de inmunoglobulina, en donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 a) una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 3 o 7; y
- b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 3 o 7, y que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR), en las que dichas regiones CDR tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12; y

15 (ii) una cadena ligera de inmunoglobulina, en donde dicha cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 20 a) una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 5 o 9; y
- b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 5 o 9, y que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR), en donde dichas regiones CDR tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15.

25 14. El polinucleótido aislado de la reivindicación 13 que comprende:

(i) una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 30 a) una secuencia de polinucleótidos expuesta en las SEQ ID NO: 2 o 6; y
- b) una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos expuesta en las SEQ ID NO: 2 o 6; y

(ii) una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 35 a) una secuencia de polinucleótidos expuesta en las SEQ ID NO: 4 o 8; y
- b) una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos expuesta en las SEQ ID NO: 4 o 8.

40 15. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 13 o de la reivindicación 14, en el que dicho polinucleótido está asociado opcionalmente de forma operativa a un promotor.

16. Una célula huésped que comprende:

- 45 (i) el polinucleótido de la reivindicación 13 o de la reivindicación 14; o
- (ii) el vector de la reivindicación 15.

Figura 1

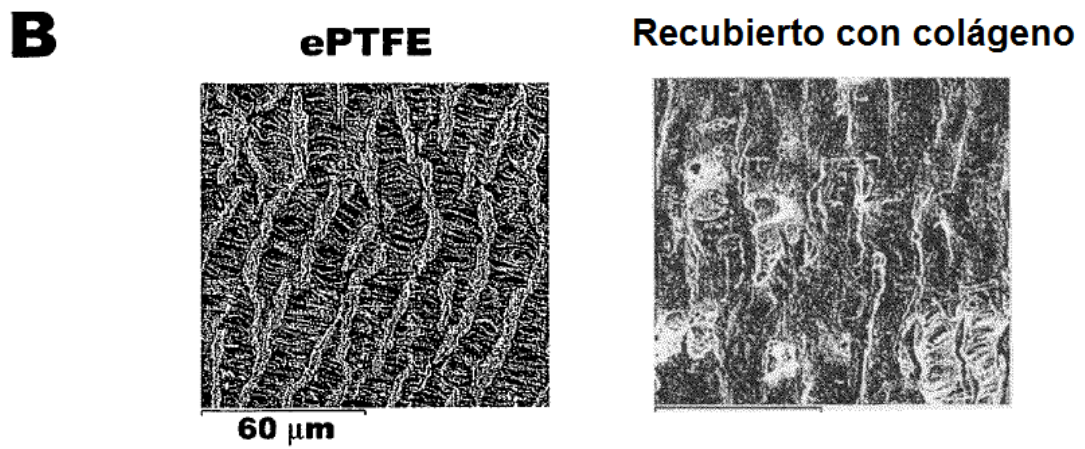
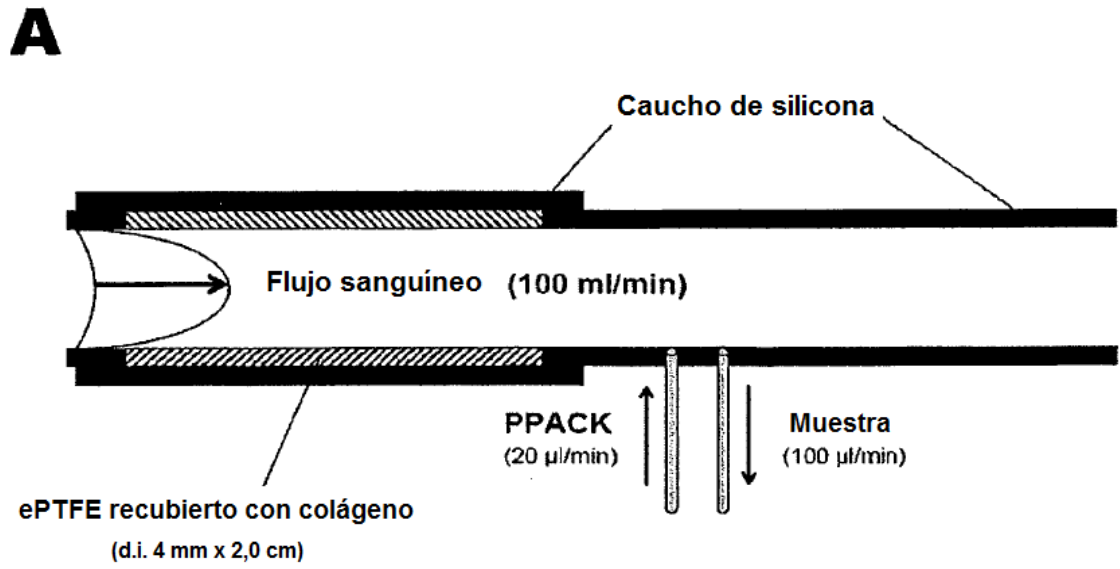


Figura 2

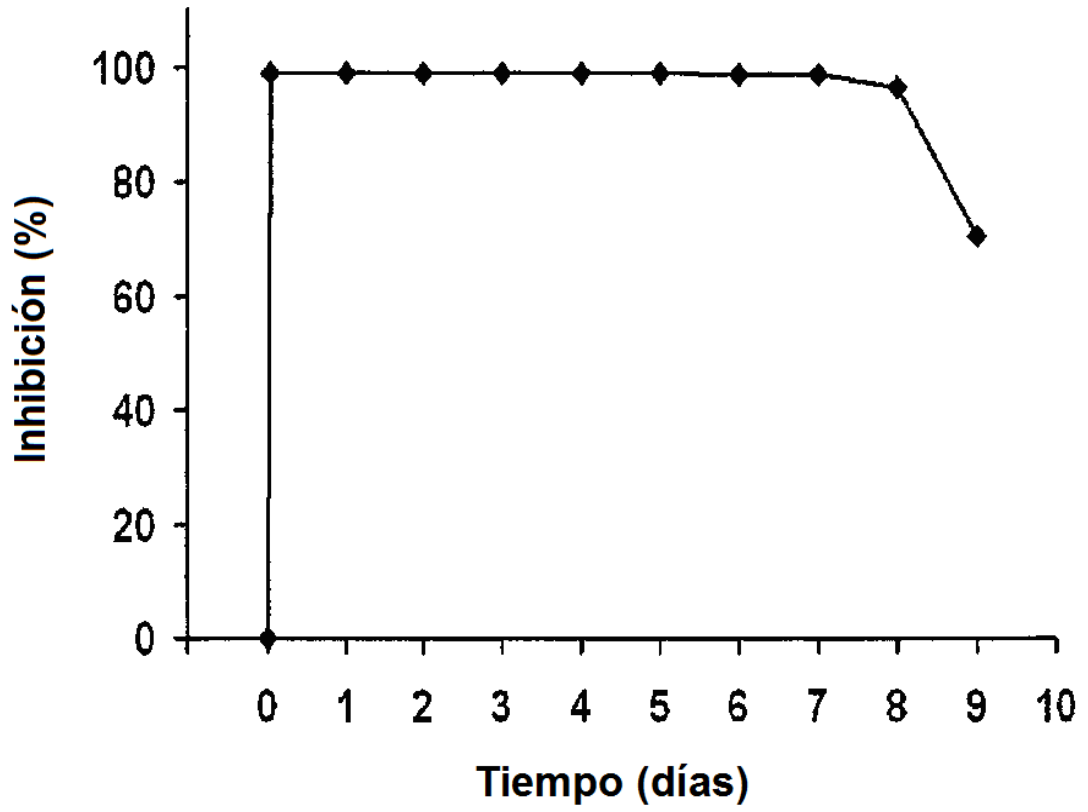


Figura 3

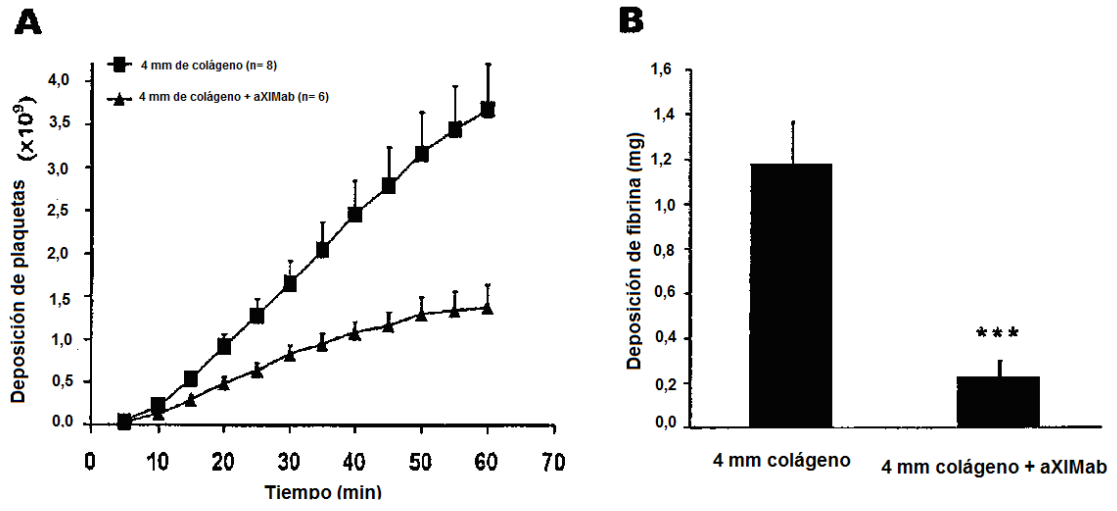


Figura 4

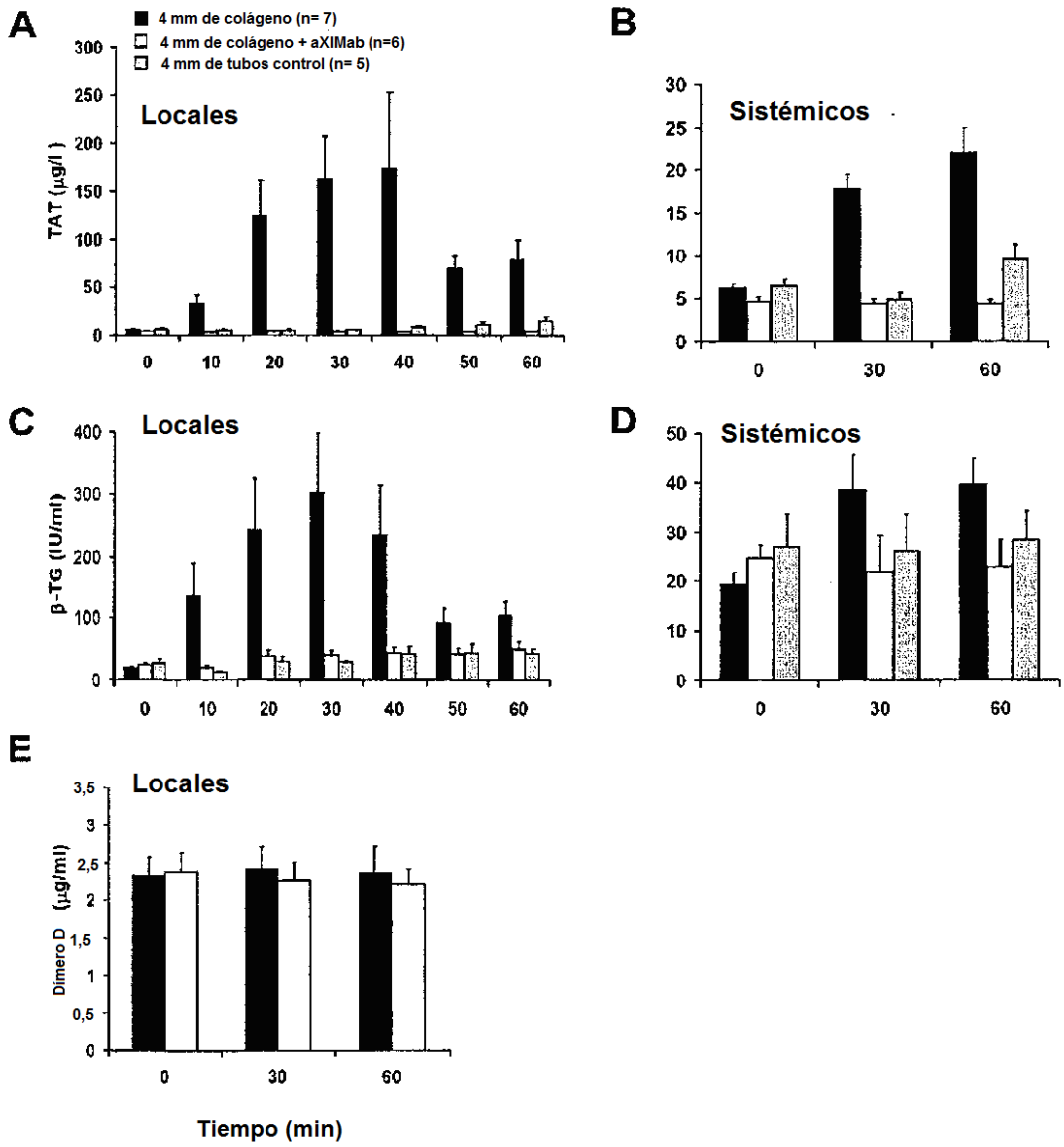


Figura 5

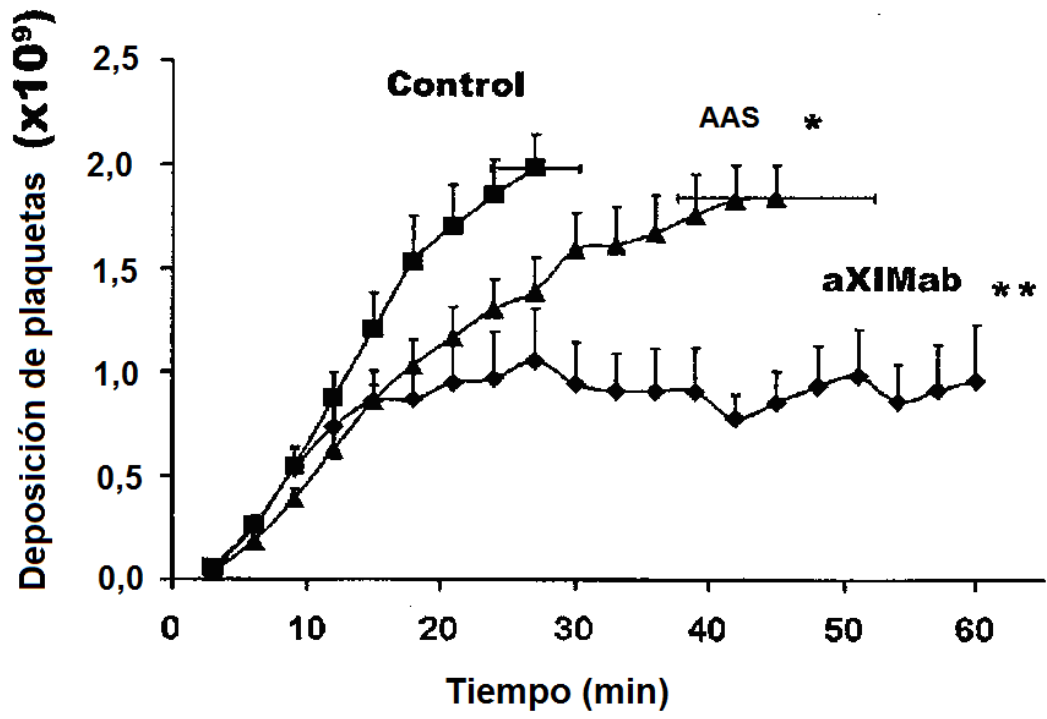


Figura 6

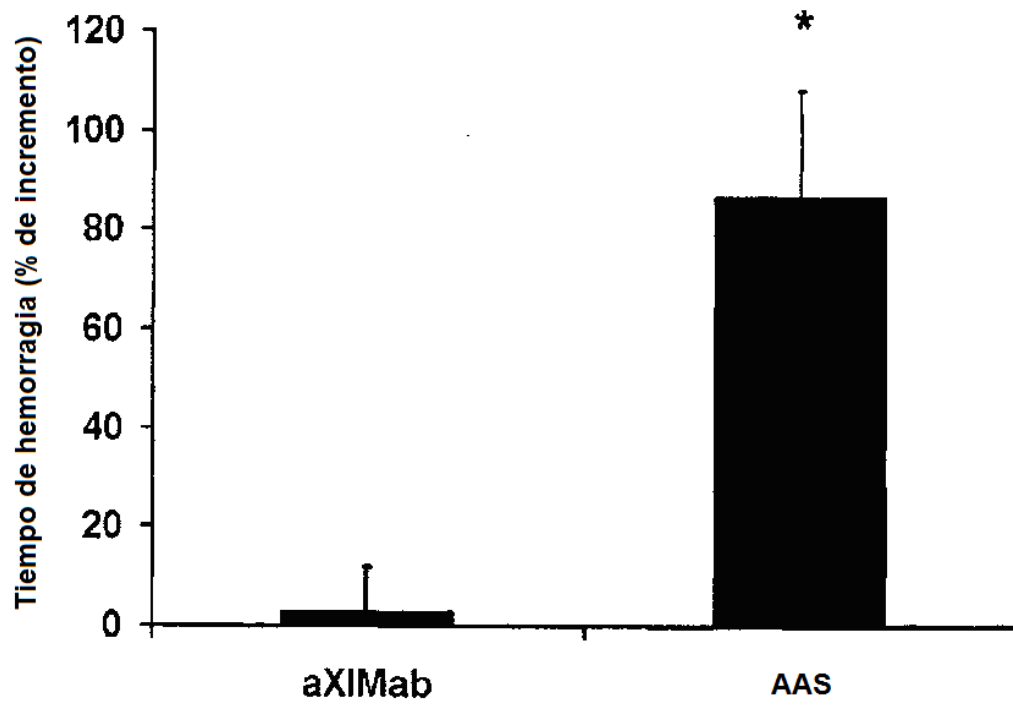


Figura 7

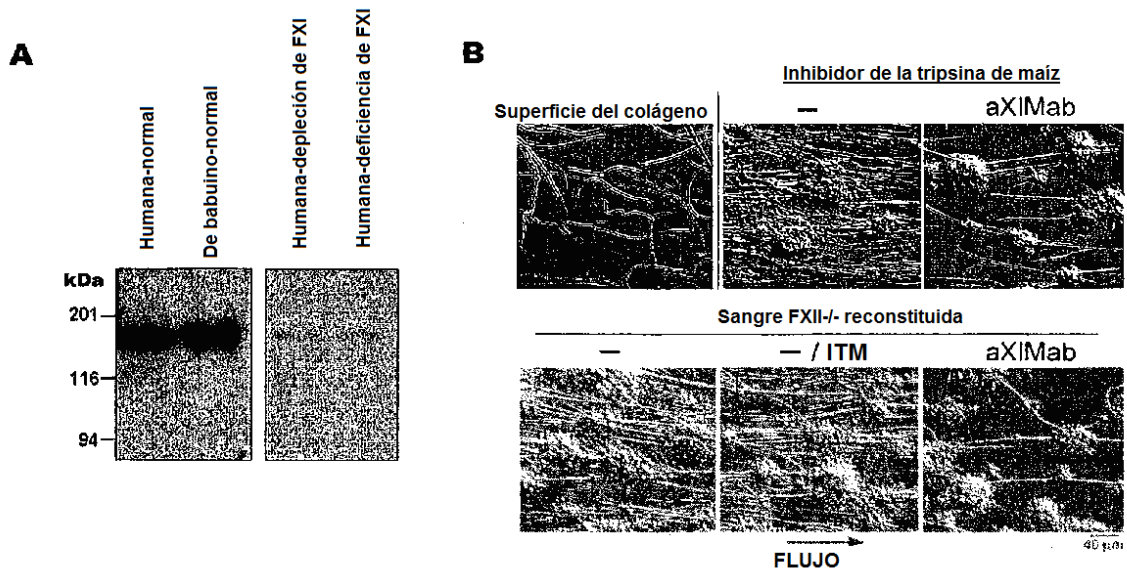


Figura 8

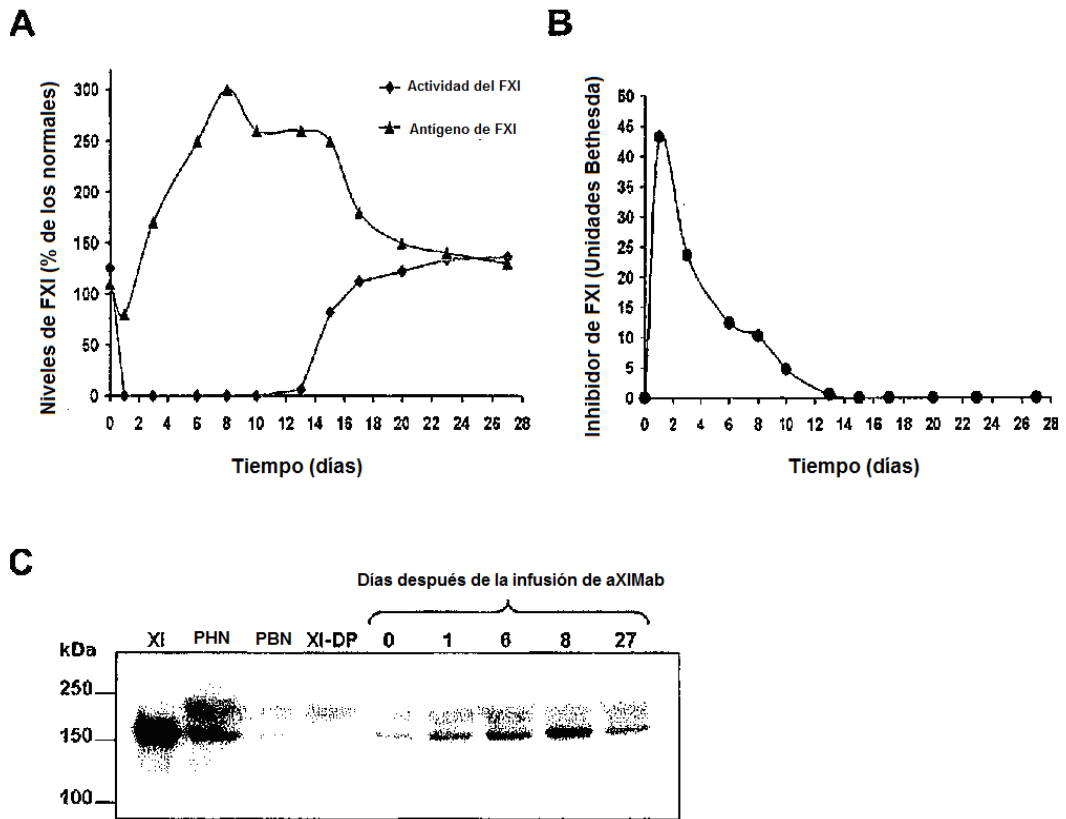
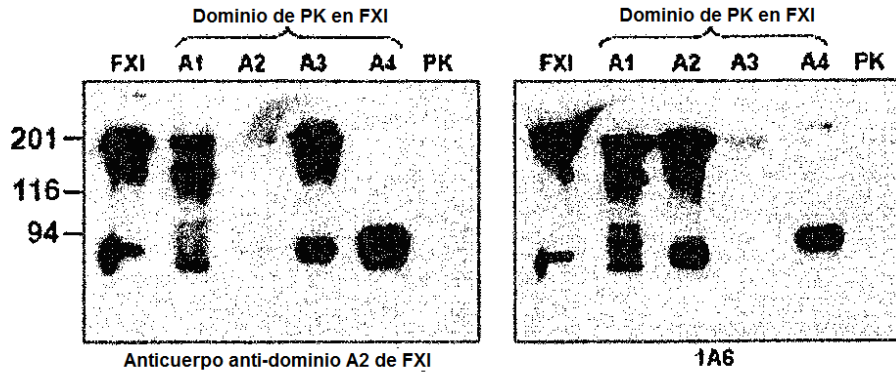


Figura 9

Transferencias Western de factor XI, precalicreína y quimeras de FXI/PK
 (el anticuerpo 1A6 no reconoce la PK ni FXI/PKA3)

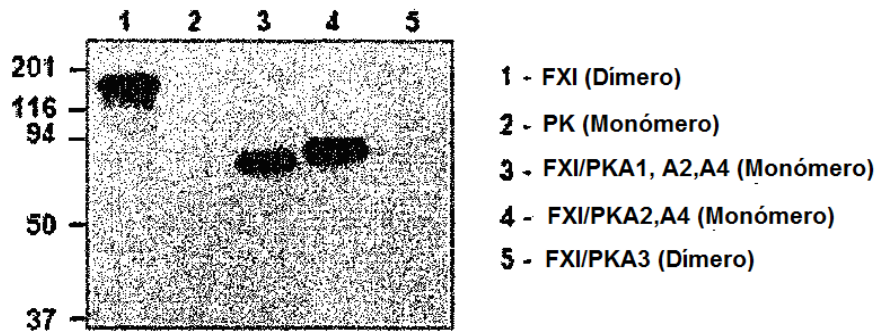


Factor XI (FXI)	F1	F2	F3	F4	Control
Precalicerina (PK)	P1	P2	P3	P4	Control
FXI/PKA1	F1	F2	F3	F4	Control
FXI/PKA2	F1	F2	F3	F4	Control
FXI/PKA3	F1	F2	F3	F4	Control
FXI/PKA4	F1	F2	F3	F4	Control

El factor XI es un dímero y la PK es un monómero. Obsérvese que el A4 de factor XI/PK es un monómero porque el dominio A4 del factor XI es necesario para la formación del dímero del factor XI

Figura 10

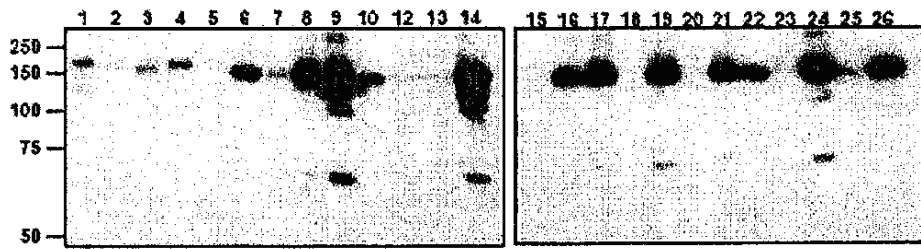
**El anticuerpo 1A6 reconoce el dominio Apple 3 del factor XI
(transferencia Western en condiciones no reductoras)**



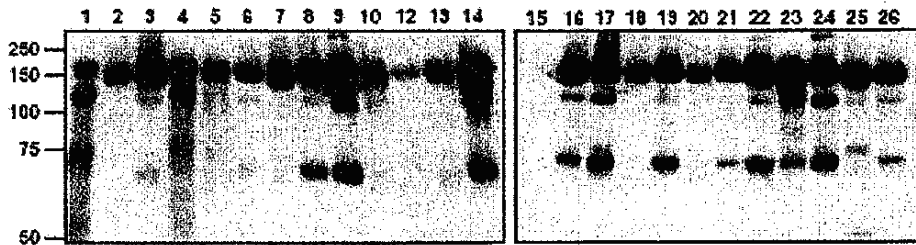
Factor XI (FXI)	F1	F2	F3	F4	Catalítico
Precalcreina (PK)	P1	P2	P3	P4	Catalítico
FXI/PK1, A2, A4	F1	F2	F3	F4	Catalítico
FXI/PK2, A4	F1	F2	F3	F4	Catalítico
FXI/PK3	F1	F2	F3	F4	Catalítico

Figura 11

Transferencias Western de mutantes de alanina del dominio A3 del factor XI
(1A6 no reconoce mutantes específicos)



Anticuerpo 1A6



Anticuerpo policlonal de cabra anti-factor XI humano

Figura 12

Dominio Apple 3 del factor XI

Posición de las sustituciones de alanina que impiden o reducen el reconocimiento por 1A6 en transferencias Western

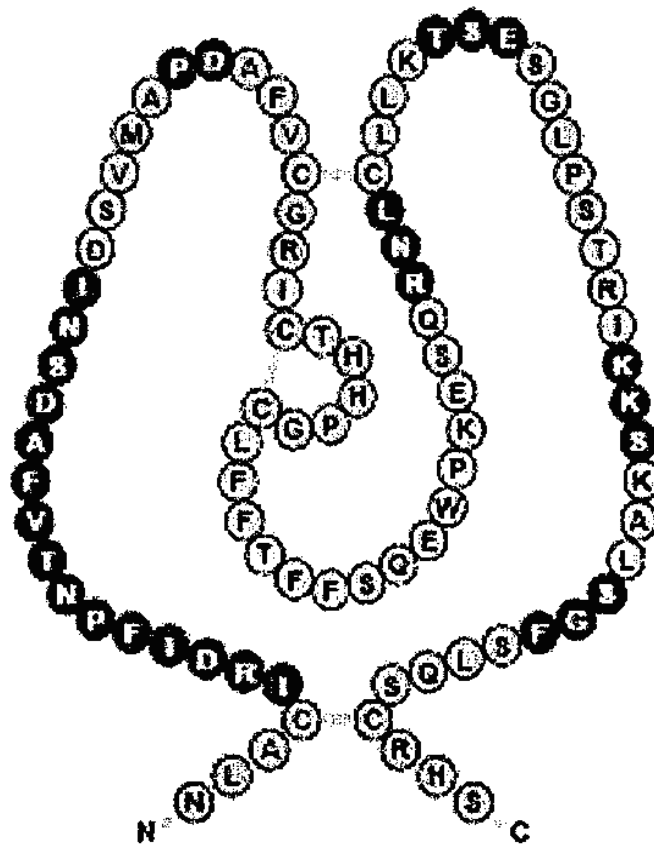


Figura 13

A.

CAAGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATAITGAAGCCCTCACAGACCCTCAGTCTGACT
 TGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTTCGTCAGCCT
 TCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAAACC
 CATCCCTGAAGAGCCAGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTTTTCTCAAG
 ATCACCAGTGTGGACGCTGCAGATACTGCCACTTACTACTGTGCTCGAAAGAGGTCTTCGGT
 TGTAGCCCATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
 (SEQ ID NO:2)

QVTLKESGPGILKPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLE
 WLAHIWWD~~DD~~KYYNPSLKSRLTISKDTSRNQVFLKITSVDAADTATY
 YCARKRSSVVAHY~~Y~~AMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:3)

B.

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCT
 CCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATCTGAACTGGTACCAAC
 AGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATC
 CCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTACCCTCAACATCCATCCTGTGGAG
 GAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGGGGATCCGTGG
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:4)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV~~DY~~DGDSYLNWYQQKPGQP
 PKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSN
 GDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)

C.

CAAGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTACCA~~TAG~~TGAAGCCCAACACAGACCCTCACTCTGACT
 TGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTTCGTCAGCCT
 TCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAAACC
 CATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCA~~CCA~~AGGATACCTCCAA~~AAA~~ACCAGGTTTCTCCTCA~~CC~~
 ATGACCA~~ATA~~TGGACGCTGTGGATACTGCCACTTACTACTGTGCTCGAAAGAGGTCTTCGGT
 TGTAGCCCATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCA~~C~~AGTCACCGTCTCCTCA
 (SEQ ID NO:6)

QVTLKESGPTIYKPTQTLTLTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKALE
 WLAHIWWD~~DD~~KYYNPSLKSRLTITKDTSK~~NQ~~VVLTMTNMD~~P~~VDTAT
 YYCARKRSSVVAHY~~Y~~AMDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:7)

D.

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGATTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGGAGAGGGCCACCATC
 ACCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATCTGAACTGGTACCAA
 CAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGAT
 CCCAG~~C~~AGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTACCCTCA~~CC~~ATCTCTTCTGTGCA
 GGAGGAGGATGTGGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGGGGATCCGTGG
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:8)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSV~~DY~~DGDSYLNWYQQKPGQP
 PKLLIYAASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ~~E~~EDVATYYCQQSN
 GDPWTFGGGTK~~V~~EIK (SEQ ID NO:9)