

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 063**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55	(2006.01)
A61K 38/57	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
C07K 16/36	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
C07K 16/40	(2006.01)
A61K 49/14	(2006.01)
C07K 14/81	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/EP2012/054142**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120124**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12707624 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2683396**

54 Título: **Inhibidores del Factor XII para el tratamiento de isquemia cerebral silente o accidente cerebrovascular**

30 Prioridad:

09.03.2011 EP 11157555
09.03.2011 US 201161457360 P
14.06.2011 US 201161496746 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2017

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (50.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(50.0%)

72 Inventor/es:

NAHRENDORF, MATTHIAS;
WEISSLEDER, RALPH;
DICKNEITE, GERHARD;
STOLL, GUIDO y
NOLTE, MARC

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 607 063 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

Inhibidores del Factor XII para el tratamiento de isquemia cerebral silente o accidente cerebrovascular

Campo

5 Esta solicitud se refiere a la isquemia cerebral silente y la isquemia de otros órganos, a un método de administración de un inhibidor del Factor XII a un paciente que recibe un procedimiento médico, y a modelos animales útiles para el estudio de la isquemia cerebral silente y la isquemia en otros órganos, y para evaluar terapias potenciales.

ANTECEDENTES

10 La isquemia cerebral silente (SBI del inglés, "silent brain ischemia") es una afección de pequeñas lesiones isquémicas en el cerebro que son un efecto secundario de procedimientos médicos, en particular de procedimientos vasculares y cirugías. La isquemia también puede tener lugar en otros órganos. Cualquier material extraño o endógeno que se libera accidentalmente en la circulación arterial durante un procedimiento médico puede dar lugar a SBI o isquemia de otros órganos, como la isquemia embólica difusa. SBI es un síndrome heterogéneo, en el que el origen exacto de un émbolo puede variar. Por ejemplo, un émbolo o microémbolo que causa SBI, o isquemia de otros órganos, puede estar compuesto por diversas sustancias, incluyendo burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos. Por lo general, la lesión isquémica es difusa. En SBI, un área del cerebro está regada con microémbolos y los focos individuales son difíciles de detectar con formación de imágenes por resonancia magnética convencional (IRM). Por ejemplo, las señales microembólicas se encuentran durante la inyección del agente de contraste y durante la toma de muestras de vasos (Bendszus M y Stoll G, 5 Lancet Neurol. 364-372, 2006). El mecanismo exacto del daño tisular en la SBI se desconoce (Bendszus M y Stoll G, 5 Lancet Neurol. 364-372, 2006).

20 Debido a la naturaleza difusa de la lesión, un paciente con SBI carece por lo general de déficits neurológicos focales, claramente definidos como en el accidente cerebrovascular. Sin embargo, se observan frecuentemente cambios de comportamiento, déficits neurosicológicos y demencia vascular agravada en un gran número de pacientes después de una cirugía mayor (por ejemplo, derivación coronaria, cirugía de reemplazo de válvula, endarterectomía carotídea o colocación de una prótesis endovascular) y en muchos pacientes con intervenciones vasculares, angiografía coronaria, líneas arteriales o dispositivos de contrapulsación intraaórtica en unidades de cuidados intensivos. Estos síntomas son muy comunes después de procedimientos médicos, pero rara vez se considera que estén relacionados directamente con el procedimiento. Con la llegada de técnicas de formación de imagen cada vez más sensibles, tales como la IRM de difusión ponderada (DWI), ha habido una concienciación cada vez mayor de lesiones en el cerebro que se presentan sin síntomas clínicos manifiestos, como parálisis o defectos de sensibilidad.

30 Hasta el 45% de los pacientes que han tenido cirugías y procedimientos, desarrollan SBI, especialmente aquellos que implican el corazón y estructuras vasculares. La angiografía coronaria, realizada más de dos millones de veces cada año en los EE.UU., tiene un riesgo de SBI del 11-15% (Bendszus M y Stoll G, 5 Lancet Neurol. 364-372, 2006). Hasta el 26% de los pacientes que fueron sometidos a angiografía diagnóstica, hasta el 54% de los pacientes que se sometieron a una colocación de prótesis endovascular en la arteria carótida y hasta el 45% de los pacientes después de una cirugía cardíaca, pueden estar afectados por SBI (Bendszus M y Stoll G, 5 Lancet Neurol. 364-372, 2006).

35 Las manifestaciones clínicas de la SBI incluyen cambios conductuales y neurosicológicos, además de un mayor riesgo de deterioro cognitivo, mayor riesgo de accidente cerebrovascular y empeoramiento de la demencia (Vermeer SE et al. 34 Stroke 1126-1129, 2003; Kobayashi S et al. 28 Stroke 1932-1939, 1997). La presencia de SBI se ha observado que duplica con creces el riesgo de demencia en pacientes con 60-90 años de edad, y da lugar a una disminución más pronunciada de la función cognitiva global y a un peor rendimiento en pruebas neurosicológicas (Vermeer SE et al. 34 Stroke 1126-1129, 2003; Lopez OL et al. 60 Arch. Neurol. 1394-1399, 2003).

40 SBI es distinta del accidente cerebrovascular clínico. Un accidente cerebrovascular clínico conduce a déficits neurológicos claramente definidos, y frecuentemente implica la ruptura espontánea de una placa vulnerable en una arteria que suministra sangre oxigenada al cerebro, o se debe a una tromboembolia del corazón causada por fibrilación auricular. En contraste con el accidente cerebrovascular, los pacientes que tienen riesgo de SBI pueden que no tengan enfermedades ateroscleróticas subyacentes o factores de riesgo para el accidente cerebrovascular o la trombosis. Los pacientes que se someten a un procedimiento vascular pueden incluir, por ejemplo, un paciente con un defecto congénito del corazón. Tales pacientes, que por lo demás están sanos, todavía tienen riesgo de SBI como un efecto secundario de los microémbolos introducidos durante un procedimiento médico (Harrison's Principles of Internal Medicine 16ª Ed. (Kasper DL, Fauci, AS, Longo, DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL compiladores, 2005)). Por lo tanto, la población de pacientes que se beneficiaría de una terapia preventiva o de un tratamiento de la SBI incluye pacientes sometidos a un procedimiento médico que implica el contacto con estructuras del sistema vascular.

55 Aunque se ha mostrado que la heparina reduce los eventos embólicos clínicamente silenciosos, provocados por una angiografía cerebral intraarterial (Bendszus et al., Circulation 110:2110-2115, 2004), tiene un riesgo relativamente alto de complicaciones hemorrágicas extra e intracraneales. Por otra parte, no está claro si los diferentes eventos de SBI, causados por diferentes tipos de émbolos, implican mecanismos moleculares similares y/o serían tratables utilizando agentes terapéuticos similares. Una terapia deseada reduciría la lesión isquémica causada por todos los

tipos de émbolos, incluyendo microémbolos compuestos por burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos, pero no afectaría a la hemostasia, tal como lo hace la heparina. De acuerdo con ello es necesario, con independencia de la causa, un tratamiento eficaz y seguro para la SBI y la isquemia en otros órganos, tal como la isquemia difusa embólica. El desarrollo de un modelo animal para estudiar la SBI y evaluar los tratamientos ha sido un reto, ya que se tienen que producir microlesiones difusas sin causar un accidente cerebrovascular manifiesto. Por lo tanto, todavía se necesitan modelos animales realistas de SBI para estudiar los mecanismos moleculares de la lesión tisular y para evaluar los candidatos terapéuticos.

El Factor XII (FXII) es una proteasa de serina que está implicada en la activación de la cascada de la coagulación intrínseca. Recientemente, se ha encontrado que la carencia o la inhibición del Factor XII en ratones, reducía el daño cerebral en modelos de accidente cerebrovascular y era protectora frente a la formación de trombos arteriales, pero sin aumentar el riesgo de hemorragia (documentos WO 2006/066878; WO 2008/098720; Kleinschnitz C et al. 203 J. Exp. Med. 513-518, 2006; Renne T et al. 202 J. Exp. Med. 271-281, 2005). Al igual que en ratones que carecen de FXII, los seres humanos que carecen de FXII no padecen diátesis hemorrágica anormal, incluso durante procedimientos quirúrgicos mayores (Ratnoff OD y Colopy JE, 34 J. Clin. Invest. 602-613, 1955; Colman RW, Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles & Clinical Practice 103-122 (Colman RW, Hirsch J, Mader VJ, Clowes AW, George J compiladores, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001); Schmaier AH, 118 J. Clin. Invest. 3006-3009, 2008).

Recientemente, se ha informado que la Infestina-4 es un nuevo inhibidor del FXII activado (FXIIa). Las infestinas son una clase de inhibidores de proteasa de serina obtenidas a partir del intestino medio del insecto hematófago *Triatoma infestans*, un vector importante para el parásito *Trypanosoma cruzi*, que se conoce que causa la enfermedad de Chagas (Campos ITN et al. 32 Insect Biochem. Mol. Bio. 991-997, 2002; Campos ITN et al. 577 FEBS Lett. 512-516, 2004). Este insecto utiliza estos inhibidores para evitar la coagulación de la sangre ingerida. El gen de Infestina codifica 4 dominios que dan lugar a proteínas que pueden inhibir diferentes factores en la vía de la coagulación. En particular, el dominio 4 codifica una proteína (Infestina-4) que es un fuerte inhibidor de FXIIa. La Infestina-4 se ha administrado a ratones sin complicaciones hemorrágicas (documento WO 2008/098720).

A pesar de los mecanismos heterogéneos que conducen a SBI e isquemia en otros órganos, incluyendo la isquemia embólica difusa, las realizaciones de esta solicitud proporcionan inhibidores de FXII, particularmente proteínas que comprenden Infestina-4, y variantes de las mismas, para el tratamiento de SBI y de isquemia en otros órganos. Además, la solicitud proporciona modelos animales de SBI que imitan diferentes tipos de émbolos que pueden entrar en la circulación durante un procedimiento médico. Los modelos animales descritos en este documento pueden ser útiles como herramientas para estudiar la SBI y evaluar candidatos terapéuticos.

El documento WO 99/36439 da a conocer péptidos de hemostasina que son inhibidores de la activación de FXII. También se describe que estos péptidos se pueden utilizar para tratar una enfermedad trombótica, tal como el accidente cerebrovascular y también para tratar pacientes sometidos a hemodiálisis o derivación cardiopulmonar.

COMPENDIO

La invención es como se define en las reivindicaciones.

La descripción proporciona un método para administrar un inhibidor del Factor XII (FXII) a un paciente que recibe un procedimiento médico, en donde el procedimiento médico comprende poner en contacto al menos uno entre: corazón; al menos un vaso sanguíneo seleccionado entre: la aorta, el arco aórtico, una arteria carótida, una arteria coronaria, arteria braquiocéfálica, circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal, una arteria hepática, una arteria mesentérica y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón; y un vaso sanguíneo venoso si el paciente tiene un defecto septal conocido. El procedimiento médico comprende la liberación de al menos un émbolo en al menos uno de dichos vasos sanguíneos en el cuerpo, lo que podría dar lugar a una isquemia de un órgano diana, y la administración del inhibidor de FXII antes, durante y/o después del procedimiento médico. Un "inhibidor de FXII" se refiere a inhibidores de uno cualquiera de Factor XII y Factor XII activado (FXIIa) o de ambos.

Un émbolo puede estar compuesto por diversos materiales. Por ejemplo, un émbolo está compuesto por burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos. En una realización, el émbolo no es un trombo.

El órgano diana es el cerebro, y el paciente tiene, ha tenido o tiene riesgo de padecer (i) isquemia cerebral silente, o (ii) un accidente cerebrovascular causado por una sustancia no trombolizable.

En una realización, el procedimiento médico comprende el contacto con el interior de al menos uno de dichos vasos sanguíneos. En otra realización, el procedimiento médico comprende el pinzamiento de uno o varios de dichos vasos sanguíneos.

En una realización, el procedimiento médico es una cirugía vascular. En ciertas realizaciones, el procedimiento médico es angiografía coronaria, colocación de prótesis endovascular en la arteria carótida, intervención coronaria percutánea, endarterectomía carotídea o una cirugía cardiovascular. En otra realización, el procedimiento médico es una dilatación de la arteria renal estenótica. En una realización, el procedimiento médico es un procedimiento vascu-

lar que es de diagnóstico. En ciertas realizaciones, el procedimiento médico es un procedimiento vascular que comprende uno cualquiera o varios entre un catéter, una prótesis endovascular, un balón y/o un injerto. En otra realización, el procedimiento médico comprende la administración de un agente de contraste, en donde, entre otras cosas, la inyección de un agente de contraste puede crear inadvertidamente burbujas de aire y/o liberar residuos.

5 En una realización, el inhibidor de FXII comprende la secuencia de polipéptidos de Infestina-4 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma. En otra realización, una variante de Infestina-4 comprende los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, y al menos de una a cinco mutaciones de aminoácidos al margen de dichos aminoácidos N-terminales, lo que da como resultado diferencias con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, y/o comprende seis residuos de cisteína conservados y homología de al menos el 70% con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre. Véase la Figura 2. En otra parte de la descripción (no reivindicada), el inhibidor de FXII comprende SPINK-1 (SEQ ID NO: 2), una proteína humana expresada en el páncreas, que está mutada para incluir los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, proporcionada como SEQ ID NO: 3, o una variante de dicha SPINK-1 mutada. En ciertas realizaciones de esta descripción, una variante de dicha SPINK-1 mutada comprende los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, y tiene al menos de una a cinco mutaciones de aminoácidos al margen de dichos aminoácidos N-terminales, lo que da como resultado diferencias con la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre y aumenta la homología de la variante con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, y/o comprende seis residuos de cisteína conservados y una homología de al menos 70% con la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre. En una realización, el inhibidor de FXII es SPINK K1, K2 o K3 (SEQ ID NO: 3, 4 o 5).

20 En otra parte de la descripción (no reivindicada), el inhibidor de FXII se selecciona entre el inhibidor de AT III, el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, el inhibidor de C1, la aprotinina, el inhibidor de la proteasa alfa-1, antipaína ([[(S)-1-carboxi-2-feniletil]carbamoil-L-Arg-L-Val-arginal), acetato de Z-Pro-Pro-aldehído-dimetilo, DX88, leupeptina, inhibidores de proil oligopeptidasa tales como Fmoc-Ala-Pyr-CN, inhibidor de tripsina de maíz, mutantes del inhibidor de la tripsina pancreática bovina, ecotina, YAP (proteína anticoagulante de la limanda japonesa), inhibidor V de la tripsina de Cucurbita maxima y/o isoINHIBIDORES de Curcubita maxima.

25 En otra realización, el inhibidor de FXII es un anticuerpo anti-FXII. Un anticuerpo anti-FXII se refiere a un anticuerpo que se une e inhibe FXII y/o FXIIa.

30 En ciertas realizaciones, el inhibidor de FXII está ligado a un polipéptido que mejora la semivida (HLEP). En una realización, el HLEP puede ser, por ejemplo, albúmina, afamina, alfa-fetoproteína o proteína que se une a vitamina D. En una realización, el HLEP puede ser albúmina humana o una variante de la misma. En otras realizaciones, el HLEP es una inmunoglobulina. La porción de inmunoglobulina puede ser un Fc de una IgG.

35 En otra realización, el inhibidor de FXII está ligado a un HLEP través de un enlazador. En una realización, el enlazador puede ser escindible. En ciertas realizaciones, el enlazador es escindido a través de una proteasa de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, extrínseca y/o común. En una realización, el enlazador es escindido por FXIIa.

40 Otro aspecto de la descripción se refiere a un modelo animal de SBI que comprende un procedimiento, en donde el procedimiento comprende la liberación de al menos un émbolo en el sistema arterial de un animal, lo que podría dar lugar a una lesión isquémica en el cerebro, y la evaluación del animal para estudiar una indicación de una lesión isquémica en el cerebro. La lesión isquémica es clínicamente silente. El término "liberación" o "que libera" en este contexto incluye tanto proporcionar una fuente externa de un émbolo en el sistema arterial del animal, como el uso de técnicas para generar un émbolo de forma interna, pero no incluye la inserción de un hilo en un vaso sanguíneo para generar un trombo. En una realización de la invención tal y como se describe, el procedimiento comprende la liberación del émbolo en el sistema arterial. En una realización, el procedimiento comprende la liberación del émbolo en la arteria carótida. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende la liberación del émbolo utilizando un catéter. En otra realización, el procedimiento comprende un pinzamiento y/o cirugía. En una realización, el modelo animal comprende evaluar el animal en busca de una lesión isquémica en otros órganos diana, incluyendo el corazón y/o el riñón. En una realización, el procedimiento no incluye la inserción de un hilo en un vaso sanguíneo para generar un trombo. En una realización, el procedimiento no causa un accidente cerebrovascular en el animal.

50 En una realización de la invención tal y como se describe, el émbolo comprende un material fluorescente. En ciertas realizaciones, el émbolo se compone de un material no trombolizable (lo que significa que el émbolo no se puede lizar empleando un agente trombolítico). En tales realizaciones, el émbolo no es un trombo. Por ejemplo, el émbolo puede estar compuesto por un polímero, burbujas, aceite, grasa, colesterol y/o residuos. En una realización, el émbolo es una microperla (incluyendo una microperla o una micropartícula). Un émbolo puede estar compuesto por 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de sustancia(s) no trombolizable(s). En otra realización, el émbolo se compone de sangre coagulada. En realizaciones, la evaluación comprende formación de imágenes y/o histología. En una realización, la formación de imágenes comprende IRM y/o SPECT. En una realización, el modelo animal es un ratón. En otra realización, el modelo animal es una rata.

En otra realización de la invención tal y como se describe, el modelo animal es para la evaluación de un candidato terapéutico para reducir la SBI. En esta realización, se administra un agente terapéutico a un animal y se somete a

5 ensayo su capacidad para reducir una lesión isquémica en el cerebro. En otra realización, el agente terapéutico se administra a un animal y se somete a ensayo su capacidad para reducir una lesión isquémica en otros órganos diana, incluyendo una isquemia embólica difusa. En ciertas realizaciones, el candidato terapéutico es un inhibidor de la vía de coagulación. En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor de FXII. En una realización, el agente terapéutico es un anticuerpo. En otra realización, el agente terapéutico es una proteína, un péptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña. En realizaciones, el candidato terapéutico se administra al animal antes, durante y/o después del procedimiento.

10 En una realización de la invención tal y como se describe, el método de formación de imágenes, que comprende IRM y/o formación de imágenes SPECT, se utiliza para evaluar una lesión isquémica en un órgano diana para el desarrollo de inhibidores de FXII. El método de formación de imágenes se lleva a cabo antes y/o después de la administración de un inhibidor de FXII. En una realización, el órgano diana es el cerebro.

Realizaciones adicionales (no necesariamente reivindicadas) se describen en los apartados siguientes.

15 **Apartado 1.** Inhibidor del Factor XII (FXII) para uso en la prevención y/o el tratamiento de isquemia en un paciente que recibe un procedimiento médico, en donde el procedimiento médico comprende el contacto con al menos uno entre:

(a) corazón,

(b) al menos un vaso sanguíneo seleccionado entre: la aorta, el arco aórtico, una arteria carótida, una arteria coronaria, arteria braquiocéfálica, circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal, una arteria hepática, una arteria mesentérica y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial próximo al corazón,

20 (c) un vaso sanguíneo venoso si el paciente tiene un defecto septal conocido;

y en donde el procedimiento médico comprende la liberación de al menos un émbolo en al menos uno de dichos vasos sanguíneos en el cuerpo lo que podría dar lugar a dicha isquemia en al menos un órgano diana y en donde el inhibidor de FXII se administra antes, durante y/o después del procedimiento médico.

25 **Apartado 2.** Inhibidor del Factor XII para uso de acuerdo con el apartado 1, en donde el émbolo se compone de burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos.

Apartado 3. Inhibidor del Factor XII para uso de acuerdo con los apartados 1 y 2, en donde el órgano diana es:

(a) el cerebro, y en donde el paciente tiene, ha tenido o tiene riesgo de isquemia cerebral silente o un accidente cerebrovascular, en donde el accidente cerebrovascular está causado por una sustancia no trombolizable; y/o

(b) el corazón, el riñón, el hígado; y/o un órgano del tracto gastrointestinal.

30 **Apartado 4.** Inhibidor del Factor XII para uso de acuerdo con los apartados 1 a 3, en donde el procedimiento médico comprende:

(i) un contacto con el interior de al menos uno o varios de dichos vasos sanguíneos;

(ii) un pinzamiento de al menos uno o varios de dichos vasos sanguíneos;

35 (iii) un procedimiento vascular que comprende uno cualquiera o varios entre un catéter, una prótesis endovascular, un balón, un injerto y/o la administración de un agente de contraste;

(iv) una cirugía vascular y/o es un procedimiento vascular que es de diagnóstico; y/o

(v) angiografía coronaria, colocación de prótesis endovascular en la arteria carótida, intervención coronaria percutánea, endarterectomía carótida, una cirugía cardiovascular o dilatación de una arteria renal estenótica.

40 **Apartado 5.** Inhibidor del Factor XII para uso de acuerdo con los apartados 1 a 4, en donde el inhibidor de FXII comprende:

(i) la secuencia de polipéptidos de Infestina-4 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma, en donde una variante comprende

45 (a) los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácidos al margen de dichos aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre; y/o

(b) seis residuos de cisteína conservados y homología de al menos 70% con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre;

(ii) SPINK-1, que está mutada para incluir los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de

tipo silvestre, o una variante de dicha SPINK-1 mutada, en donde una variante comprende

(a) los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácidos al margen de dichos aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias con la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre y que incrementan la homología de la variante con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre; y/o

(b) seis residuos de cisteína conservados y homología de al menos 70% con la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre;

(iii) inhibidor de AT III, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, inhibidor de C1, aprotinina, inhibidor de la proteasa alfa-1, antipaína ([[(S)-1-carboxi-2-feniletil]carbamoil-L-Arg-L-Val-arginal), acetato de Z-Pro-Pro-aldehído-dimetilo, DX88, leupeptina, inhibidores de prolil oligopeptidasa tales como Fmoc-Ala-Pyr-CN, inhibidor de tripsina de maíz, mutantes del inhibidor de la tripsina pancreática bovina, ecotina, YAP (proteína anticoagulante de la limanda japonesa), inhibidor V de la tripsina de Cucurbita máxima, isoINHIBIDORES de Cucurbita maxima y/o Pro-Phe-Arg-clorometil-cetona (PCK); y/o

(iv) anticuerpo anti-FXII, en donde el anticuerpo se une a FXII e inhibe su actividad y/o activación.

Apartado 6. Inhibidor del Factor XII para uso de acuerdo con el apartado 5, en donde la variante de SPINK-1 mutada es SPINK K1, K2 o K3 (SEQ ID NO: 3, 4 o 5).

Apartado 7. Inhibidor del Factor XII para uso de acuerdo con el apartado 1 a 5, en donde el inhibidor de FXII está ligado a un polipéptido que mejora la semivida, en donde el polipéptido que mejora la semivida es opcionalmente:

(i) albúmina, afamina, alfa-fetoproteína o proteína que se une a vitamina D; o

(ii) albúmina humana o una variante de la misma; o

(iii) una inmunoglobulina o una variante de la misma; o

(iv) un Fc de una IgG.

Apartado 8. Inhibidor del Factor XII para uso de acuerdo con el apartado 7, en donde el polipéptido que mejora la semivida está ligado al inhibidor de FXII a través de un enlazador y en donde el enlazador es escindible opcionalmente por una proteasa de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, extrínseca o común.

Apartado 9. Uso de un método de formación de imágenes para el desarrollo de inhibidores del Factor XII, que comprende administrar un candidato de inhibidor del Factor XII y evaluar el efecto del candidato de inhibidor del Factor XII sobre una isquemia en un órgano diana de un animal utilizando radiología o medicina nuclear, por ejemplo, CT (opcionalmente SPECT-CT y/o FMT-CT); IRM (opcionalmente IRM de difusión ponderada (DWI) y/o IRMf); PET; formación de imágenes ópticas (opcionalmente, formación de imágenes por reflectancia fluorescente; ultrasonidos, microscopía, fluoroscopia, autorradiografía y/o formación de imágenes con fósforo), en donde la isquemia está causada por un émbolo, y

(i) el órgano diana es cerebro, corazón, riñón, hígado y/o un órgano del tracto gastrointestinal y

(ii) si el órgano diana es el cerebro, además la lesión isquémica es clínicamente silente y/o el émbolo no es trombolizable.

Apartado 10. Uso de un método histológico para el desarrollo de inhibidores del Factor XII, que comprende administrar un candidato de inhibidor del Factor XII y evaluar el efecto del candidato de inhibidor del Factor XII sobre una isquemia en un órgano diana de un animal empleando tinción TTC, inmunohistoquímica y/o histoquímica, en donde la isquemia está causada por un émbolo, y

(i) el órgano diana es cerebro, corazón, riñón, hígado y/o un órgano del tracto gastrointestinal y

(ii) si el órgano diana es el cerebro, además la lesión isquémica es clínicamente silente y/o el émbolo no es trombolizable.

Apartado 11. Un modelo animal de isquemia que comprende

(a) un procedimiento, en donde el procedimiento comprende la liberación intencionada de al menos un émbolo en el sistema arterial lo que podría dar lugar a una lesión isquémica en al menos un órgano diana,

(i) en donde el órgano diana es cerebro, corazón, riñón, hígado y/o un órgano del tracto gastrointestinal; y

(ii) si el órgano diana es el cerebro, además la lesión isquémica es clínicamente silente y/o el émbolo no es trombolizable; y

(b) evaluar el animal en busca de una indicación de una lesión isquémica en el órgano diana.

Apartado 12. El método de acuerdo con el apartado 9 a 11, en donde el procedimiento comprende

(i) la liberación del émbolo en un vaso sanguíneo;

(ii) la liberación del émbolo en una arteria;

5 (iii) la liberación del émbolo en el corazón, aorta, arco aórtico, arteria carótida, arteria coronaria, arteria braquiocefálica, circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal, arteria hepática, arteria mesentérica, y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón; y/o

(iv) la liberación del émbolo en una arteria carótida.

10 **Apartado 13.** El método de acuerdo con los apartados 9 o 11, en donde la etapa de evaluación comprende la formación de imágenes por resonancia magnética y/o la formación de imágenes SPECT.

Apartado 14. El método de acuerdo con los apartados 9 a 11, para la evaluación de un candidato terapéutico para el tratamiento de la isquemia, en donde

15 (i) el candidato terapéutico se somete a ensayo para estudiar su capacidad para reducir una lesión isquémica en el órgano diana, y en donde el candidato terapéutico se administra al animal antes, durante y/o después del procedimiento; y/o

(ii) el candidato terapéutico es un inhibidor de la vía de coagulación.

Apartado 15. El método de acuerdo con los apartados 9 a 14, en donde el candidato terapéutico es

(i) un inhibidor de FXII o

(ii) un anticuerpo o

20 (iii) una molécula pequeña.

Objetos y ventajas adicionales de las realizaciones en la solicitud aparecen en parte en la siguiente descripción y en parte serán obvios a partir de la descripción, o se pueden aprender con la práctica. Los objetos y las ventajas de las realizaciones se manifestarán ellos mismos por medio de los elementos y combinaciones particularmente indicados en las reivindicaciones adjuntas.

25 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El documento de la patente o de la solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta patente o solicitud de patente con dibujos en color serán proporcionadas por la Oficina bajo previa petición y pago de la tasa necesaria.

30 **Figura 1.** Sitios de contacto del inhibidor de *R. prolixus* con trombina y de SPINK-1 con quimotripsina. # indica los aminoácidos que son sitios de contacto entre el inhibidor de *R. prolixus* y la trombina; + indica los aminoácidos que son sitios de contacto entre SPINK-1 y quimotripsina.

Figura 2. Similitud de la secuencia de aminoácidos entre Infestina-4 (I4) y SPINK-1 (SP). * indica un aminoácido idéntico; | indica un aminoácido similar; los aminoácidos en negrita son cisteínas conservadas; los aminoácidos 2-13 subrayados de la secuencia de Infestina-4 están conservados.

35 **Figura 3.** Secuencias de aminoácidos de Infestina-4, SPINK1 y tres variantes de SPINK1 (K1, K2 y K3). * indica idéntico; aminoácidos similares con respecto a la secuencia de Infestina-4. La secuencia subrayada de I4 se utilizó para reemplazar 15 aminoácidos de SPINK-1 para generar K1. Las variantes K2 y K3 se generaron mediante mutaciones puntuales adicionales (aminoácidos subrayados) en la secuencia de K1.

40 **Figura 4.** Modelo. (A) Imagen fluorescente de microperlas FTC+ antes de la inyección. (B) Imagen fluorescente de sangre coagulada formada y marcada *ex vivo* a partir de sangre fresca de ratón. (C) Boceto que ilustra la administración de los émbolos. El catéter a administrar se inserta en la arteria carótida externa (ECA). ICA: arteria carótida interna, CCA: arteria carótida común. Durante la inyección, la CCA se ligó temporalmente para forzar los émbolos en la ICA. (D, E) Imágenes fluorescentes de la superficie del cerebro después de la inyección de microperlas (D) o sangre coagulada (E).

45 **Figura 5.** rHA-Infestina-4 reduce la lesión cuantificada con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). La evaluación de los daños tisulares mediante tinción con TTC 3 días después de la administración de un émbolo, se muestra en el gráfico de barras. Se muestran cortes con TTC representativos e imágenes fluorescentes por reflectancia de la sección correspondiente del cerebro. Los datos se presentan como medio + error estándar de la media. *p < 0,05.

Figura 6. La hemorragia secundaria no se incrementa con rHA-Infestina-4 (día 3). Evaluación de hemorragia secundaria 3 días después de la inyección de perlas o sangre coagulada. Un corte de cerebro representativo se muestra para cada ratón. Fotogramas rojos indican ratones en los que se detectó hemorragia (flechas).

5 **Figura 7.** rHA-Infestina-4 reduce la actividad de FXIII en el área lesionada después de la administración de sangre coagulada evaluada por SPECT-CT. La actividad transglutaminasa plasmática (FXIIIa) se evaluó 3 horas después de la administración de un émbolo compuesto por sangre coagulada. FRI: formación de imágenes fluorescentes por reflectancia que muestran la ubicación de la sangre coagulada. % de IDGT se refiere a la dosis inyectada por gramo de tejido. TBR: Relación entre la diana y el ruido de fondo. Datos presentados como media + error estándar de la media. * $p < 0,05$.

10 **Figura 8.** rHA-Infestina-4 reduce la actividad de FXIII en el área lesionada después de la administración de microperlas evaluadas por SPECT-CT. La actividad transglutaminasa plasmática (FXIIIa) se evaluó 3 horas después de la aplicación de los émbolos de perlas. FRI: formación de imágenes fluorescentes por reflectancia que muestran la ubicación de las perlas. % de IDGT se refiere a la dosis inyectada por gramo de tejido. TBR: Relación entre la diana y el ruido de fondo. Datos presentados como media + error estándar de la media. * $p < 0,05$.

15 **Figura 9.** Inmunohistoquímica para FXIII. Tinción inmunohistoquímica para FXIII 3 horas después de la administración de perlas o sangre coagulada. La barra indica 50 μm .

20 **Figura 10.** No hay cambios en la actividad de MPO medida por IRM después de la administración de sangre coagulada. Evaluación de la actividad de MPO 3 días después de la administración de un émbolo compuesto por sangre coagulada. FRI: formación de imágenes fluorescentes por reflectancia que muestran la ubicación de la sangre coagulada. AU: Unidades arbitrarias. CNR: Relación entre contraste y ruido. Datos presentados como media + error estándar de la media. * $p < 0,05$.

25 **Figura 11.** No hay cambios en la actividad de MPO medida por IRM después de la administración de microperlas. Evaluación de la actividad de MPO 3 días después de la administración de los émbolos de microperlas. FRI: formación de imágenes fluorescentes por reflectancia que muestran la ubicación de las perlas. AU: Unidades arbitrarias. CNR: Relación entre contraste y ruido. Datos presentados como media + error estándar de la media. * $p < 0,05$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 Las realizaciones de la invención tal y como se describen, se refieren a un método para administrar un inhibidor del Factor XII (FXII) a un paciente que recibe un procedimiento médico, en donde el procedimiento médico comprende el contacto con al menos uno entre: corazón; al menos un vaso sanguíneo seleccionado entre: la aorta, el arco aórtico, la arteria carótida, una arteria coronaria, arteria braquiocefálica, circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal, una arteria hepática, una arteria mesentérica y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón; y un vaso sanguíneo venoso si el paciente tiene un defecto septal conocido. El procedimiento médico comprende la liberación de al menos un émbolo en al menos uno de dichos vasos sanguíneos en el cuerpo, lo que podría dar lugar a isquemia en un órgano diana, y la administración del inhibidor de FXII antes, durante y/o después del procedimiento médico. La isquemia puede estar causada por diversos tipos de émbolos, independientemente de si el émbolo se compone de burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos. El órgano diana es el cerebro, y el paciente tiene SBI, ha tenido SBI o tiene riesgo de padecer SBI. Además, la descripción proporciona modelos animales de SBI que pueden ser útiles para el estudio de SBI y para la evaluación de candidatos terapéuticos.

40 Una ventaja de las realizaciones de la solicitud es que la SBI se puede reducir en pacientes que tienen una variedad de procedimientos médicos o que presentan o no diferentes estados de enfermedad. El éxito del método no depende de si un paciente tiene o no cualquiera de los siguientes procedimientos o estados de enfermedad. Por lo tanto, el éxito del método no depende de si el paciente tiene o no alguna enfermedad subyacente o, por ejemplo, un riesgo subyacente de trombosis. De hecho, se cree que el método funciona con eficacia en pacientes sin un riesgo subyacente de trombosis, por ejemplo, pero que están recibiendo un procedimiento médico, por ejemplo, para corregir un defecto congénito del corazón. Por lo tanto, la población de pacientes es más amplia y, por lo tanto, distinta de la población de pacientes que tiene riesgo de trombosis. La solicitud pretende reivindicar subgrupos de poblaciones de pacientes incluyendo o excluyendo los que tienen ciertos procedimientos o estados de enfermedad.

I. Definiciones

50 La abreviatura "FXII", tal y como se usa en esta solicitud, se refiere a uno cualquiera de Factor XII y Factor XII activado (FXIIa) o a ambos. Por ello, la expresión "inhibidor de FXII" incluye inhibidores de uno cualquiera de FXII y FXIIa o de ambos. Además, los anticuerpos anti-FXII incluyen anticuerpos que se unen e inhiben a uno cualquiera de FXII y FXIIa o a ambos.

55 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "isquemia" se refiere al estado en un paciente humano o un animal, en el que un suministro insuficiente de sangre a un tejido o un órgano diana dará lugar si no se trata a una lesión isquémica. Por ejemplo, "isquemia cerebral" o del cerebro se refiere a una reducción de la sangre en el cerebro, de manera que el suministro de oxígeno no satisface la demanda del tejido cerebral. Un "infarto" cerebral se

refiere a tejido cerebral muerto que puede tener lugar si la isquemia o el cese de flujo sanguíneo dura el tiempo suficiente para causar muerte celular. Los infartos se pueden caracterizar mediante tomografía computarizada (CT, del inglés Computed Tomography) o IRM. Los infartos también pueden referirse a tejido muerto debido a pequeñas lesiones isquémicas o microlesiones que se caracterizan como difusas y demasiado pequeñas para dar lugar a cambios claros en una IRM convencional. Tales pequeños infartos pueden ser visibles con modalidades de formación de imagen más sensibles, tales como la IRM de difusión ponderada.

La expresión "lesión isquémica", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un espectro de daños que pueden ocurrir en un órgano diana como consecuencia de una isquemia, tal como una isquemia difusa o focal, microdaños, isquemia transitoria, microlesiones, lesiones, microinfartos o infartos. Las lesiones isquémicas se pueden caracterizar adicionalmente porque pueden estar causadas por un émbolo que comprende burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos.

Dependiendo del tamaño del émbolo, se pueden generar diferentes eventos. Por ejemplo, si el émbolo, tal como una sustancia no trombolizable (que incluye una burbuja de aire), es más grande, podría causar un accidente cerebrovascular. Tal evento podría ser un efecto secundario de una cirugía de corazón o un procedimiento intraarterial. Si el émbolo, como por ejemplo una burbuja de aire, es más pequeño o hay una pluralidad de pequeños émbolos, tal como una pluralidad de burbujas de aire, podría causar una SBI. En una realización, el accidente cerebrovascular, por ejemplo, está causado por un émbolo compuesto por una burbuja de aire.

El término "silente", cuando se refiere a "isquemia cerebral silente" ("SBI"), o un "infarto cerebral silente", o "clínicamente silente", se refiere a un estado de isquemia en el tejido cerebral que carece de síntomas agudos y evidentes que definen el accidente cerebrovascular, como por ejemplo, hemiparesia, hipoestesia y/o afasia. Un accidente cerebrovascular se puede definir como cualquier evento clínico agudo relacionado con un deterioro de la circulación cerebral que se traduce en un déficit neurológico focal que tiene una duración de más de 24 horas. La SBI puede estar asociada con déficits neurológicos más sutiles, incluyendo, pero no limitados a, cambios de comportamiento, empeoramiento de la capacidad cognitiva, déficits del campo visual, trastornos en brazos y piernas, fragilidad, síntomas depresivos, disminución de la función física y agravamiento de la demencia vascular. Por ejemplo, los infartos que se relacionan con un ataque isquémico transitorio previo o síntomas similares al accidente cerebrovascular, se pueden definir como sintomáticos, mientras que los que no tienen síntomas similares correspondientes al accidente cerebrovascular, se pueden definir como "silentes". El término "silente" no quiere decir que no haya síntomas; significa que los síntomas son distintos de los del accidente cerebrovascular típico y generalmente más sutiles, y en ciertos casos solo se manifiestan de otras formas, que se podrían detectar solo con una formación de imágenes sofisticada o pruebas más intensas, tales como pruebas cognitivas. El término "difuso", cuando se refiere a una isquemia embólica difusa en un órgano, se refiere a una característica de la isquemia, que está causada por una dispersión de los émbolos a más de un lugar en el órgano, es decir, la isquemia no es focal.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "reducción" comprende una disminución de la probabilidad de una SBI en un individuo o en un animal, la reducción de la gravedad de cualquier síntoma y/o la reducción de la proporción de pacientes en una población que tiene riesgo de SBI, que en realidad tiene una SBI.

De este modo, "reducción" se refiere a la aminoración, disminución, descenso, limitación, recuperación o mejora de un estado de SBI. La reducción de SBI puede incluir, por ejemplo, una protección frente a la aparición de SBI; reducir el riesgo de SBI, reducir la gravedad de SBI a medida que se desarrolla o una vez que se ha desarrollado; limitar el daño de una SBI, por ejemplo, limitando que una lesión isquémica se convierta en un infarto; reducir la difusión de una SBI, por ejemplo, limitando la cantidad de área cerebral o de vasos sanguíneos que se ven afectados o dañados por una lesión isquémica; o mejorar las afecciones en el cerebro asociadas con una SBI, como inflamación o edema.

En una realización, el paciente tiene o ha tenido una SBI. En ciertas realizaciones, el paciente tiene "riesgo" de padecer SBI. Un paciente que tiene "riesgo" de padecer SBI, incluye un paciente que ha recibido, recibe o recibirá un procedimiento médico que comprende el contacto con uno cualquiera entre: corazón; aorta, arco aórtico, una arteria carótida, una arteria coronaria, arteria braquiocefálica, circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal, una arteria hepática, una arteria mesentérica y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón; y un vaso sanguíneo venoso si el paciente tiene un defecto septal conocido. Un paciente que tiene "riesgo" de padecer SBI ha recibido, está recibiendo o recibirá un procedimiento médico que comprende la liberación de al menos un émbolo en un vaso sanguíneo en el cuerpo. Un método de administración de un inhibidor de FXII a un paciente que tiene, ha tenido o tiene "riesgo" de padecer SBI puede tener lugar antes, durante y/o después del procedimiento médico para limitar la aparición de una SBI, o para limitar el desarrollo o aminorar el daño de una SBI. En ciertas realizaciones, el paciente no tiene por qué tener una SBI para que se administre el inhibidor de FXII. Por ejemplo, un paciente puede no tener una SBI antes del procedimiento médico, o puede ser desconocido si el paciente tiene una SBI antes, durante y/o después del procedimiento médico, pero en estos casos, el paciente tiene "riesgo" de padecer una SBI debido al procedimiento médico y, por lo tanto, se puede administrar el inhibidor de FXII. En ciertas realizaciones, el paciente o el animal pueden tener una SBI antes, durante y/o después de la administración del inhibidor de FXII. En ciertas realizaciones, el paciente o el animal pueden no tener una SBI antes, durante y/o después de la administración del inhibidor de FXII.

La expresión "podría tener lugar" se entiende que incluye la situación en la que la isquemia tiene lugar en un órgano

diana en un paciente o un animal que recibe un procedimiento que genera un émbolo y el paciente o el animal aún no ha recibido el inhibidor de FXII; también incluye la situación en la que no se produce una isquemia de un órgano diana en un paciente o un animal que recibe un procedimiento, ya que el paciente o el animal ha recibido previamente o al mismo tiempo una administración del inhibidor de FXII. La isquemia (y cualquier infarto que se pueda haber producido si la isquemia continuó) tampoco puede tener lugar si el paciente o el animal recibe el inhibidor de FXII al cabo de un corto período de tiempo, después del procedimiento, tal como al cabo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 30 minutos, al cabo de 1 hora, o al cabo de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 72 o 96 horas de la conclusión del procedimiento.

Por ejemplo, en el modelo animal, el inhibidor de FXII se puede administrar antes, durante y/o poco (como se ha definido anteriormente) después del procedimiento y, por lo tanto, el animal no puede desarrollar una SBI. En otra realización del modelo animal, el inhibidor de FXII se puede administrar después del procedimiento, y el animal puede desarrollar una SBI. Este término también se refiere al hecho de que no todos y cada uno de los pacientes que reciben uno de los procedimientos médicos comprendidos tiene, de hecho, un émbolo desplazado. Cada una de estas situaciones se incluye en la descripción de esta solicitud.

La expresión "que induce una isquemia cerebral silente" en un sujeto animal se refiere al método en el que dicho animal tiene una indicación de una lesión isquémica, tal como un infarto cerebral, por ejemplo, mediante formación de imágenes y/o histología, y en donde los síntomas son clínicamente silentes, como se han descrito anteriormente y en el Ejemplo 2A.

Un paciente "que recibe" un procedimiento médico se refiere a un paciente que se va a someter a un procedimiento médico, que está recibiendo un procedimiento médico o que ha tenido un procedimiento médico.

La expresión "que permite" tal como se usa en "que permite que el inhibidor de FXII reduzca una lesión isquémica" se define como la administración de un inhibidor de FXII en una cantidad y a través de una vía de administración que es suficiente para reducir una lesión isquémica en el cerebro. Los términos "reducir" y "lesión isquémica" se han definido anteriormente. La cantidad de lesión isquémica se puede evaluar por varias modalidades de formación de imágenes, que incluyen pero no se limitan a IRM y/o CT.

"Émbolo" se refiere a cualquier material intravascular desplazado compuesto por un sólido, líquido o gas que es capaz de ocluir un vaso. La oclusión puede ocurrir en un sitio distante del punto de origen. La composición de un émbolo incluye, pero no se limita a, burbujas o CO₂; aceite, grasa, colesterol; residuos, tales como residuos de vasos, por ejemplo, calcificaciones, tejido o fragmentos de tumor; sangre coagulada, un organismo tal como bacterias o un parásito, u otro agente infeccioso; o material extraño. El término "burbujas" incluye un émbolo formado por aire u otro gas, o en ciertos casos, un líquido que no es sangre o sangre coagulada. Una burbuja puede tener forma esférica o no esférica. En una realización, el émbolo no es un trombo. En otra realización, un émbolo se compone de sangre coagulada. El término "microémbolo" está incluido en el término "émbolo", tal como se usa en el presente documento, y se refiere a un émbolo de tamaño microscópico y puede estar compuesto por los mismos materiales que un émbolo como se ha definido anteriormente. Por tanto, un "émbolo" incluye émbolos en singular o plural, microémbolos, lluvias de émbolos o lluvias de microémbolos.

Un émbolo puede ser un émbolo arterial, en donde la materia intravascular desplazada está en una arteria o un vaso del sistema arterial. En una realización, un émbolo es un "émbolo paradójico", que se refiere a un émbolo de origen venoso que pasa al sistema arterial, por ejemplo, debido a un defecto septal.

"Homología" se refiere al porcentaje de la cantidad de aminoácidos que son idénticos o que constituyen sustituciones conservadoras. La homología se puede determinar usando programas de comparación de secuencias, tales como GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395), que se incorpora en esta memoria como referencia. De esta manera, se podrían comparar secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente con las citadas en el presente documento, mediante la inserción de huecos en la alineación, en donde tales huecos están determinados, por ejemplo, por el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

II. Procedimientos médicos

En una realización de la invención tal como se describe, un inhibidor de FXII se administra a un paciente que recibe un procedimiento médico. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "procedimiento médico" se refiere a un acto de diagnóstico, intervención, tratamiento o cirugía. En una realización, el procedimiento médico comprende un contacto con al menos uno entre: corazón; al menos un vaso sanguíneo seleccionado entre: la aorta, el arco aórtico, la arteria carótida, una arteria coronaria, la arteria braquiocefálica, la circulación vertebrobasilar, las arterias intracraneales, la arteria renal, una arteria hepática, una arteria mesentérica y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón; un vaso sanguíneo venoso si el paciente tiene un defecto septal conocido. Tal como se utiliza en este documento, el término "contacto" se refiere a tocar físicamente dichas estructuras vasculares a través de un instrumento, un objeto externo, una persona, por ejemplo, un cirujano, o cualquier otro objeto que toca dicha estructura vascular debido al procedimiento médico. En una realización, el procedimiento médico comprende el contacto con el interior de al menos uno de dichos vasos sanguíneos. En ciertas realizaciones, el procedimiento médico comprende el pinzamiento de uno o varios de dichos vasos sanguíneos. En realizaciones, el proce-

dimiento médico incluye la liberación de un émbolo y el émbolo puede estar compuesto por burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos. En realizaciones, el procedimiento médico comprende cualquiera o varios entre un catéter, una prótesis endovascular, un balón, un injerto y/o administrar un agente de contraste, que, entre otros, la inyección de un agente de contraste puede crear inadvertidamente burbujas de aire y/o desplazar residuos.

5 En una realización, el procedimiento médico es un procedimiento vascular. La expresión "procedimiento vascular" incluye cualquier procedimiento que afecta al corazón o a un vaso sanguíneo, en donde un vaso se define como una estructura que transporta o contiene sangre. Los procedimientos vasculares pueden implicar, por ejemplo, utilizar un catéter o administrar un agente de contraste. En ciertas realizaciones, el procedimiento médico implica el sistema arterial, haciendo referencia a un procedimiento que implica una arteria, ramificaciones arteriales, arteriolas, capilares o vasos implicados en el transporte de sangre desde el corazón. En realizaciones, el procedimiento médico implica uno o varios de los siguientes vasos: la aorta, el arco aórtico, una arteria carótida, una arteria coronaria, arteria braquiocéfálica, circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal; una arteria hepática, incluyendo, por ejemplo, la arteria hepática común y/o la arteria hepática propia; una arteria mesentérica, incluyendo por ejemplo, la arteria mesentérica superior y/o la arteria mesentérica inferior; y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón; un vaso sanguíneo venoso si el paciente tiene un defecto septal conocido.

El término "diagnóstico" se refiere a un procedimiento que se realiza para identificar o evaluar una afección, una enfermedad o un trastorno. Un procedimiento de diagnóstico puede implicar por ejemplo, usar uno cualquiera o varios entre un catéter, una prótesis endovascular, un balón, un injerto y/o la administración de un agente de contraste.

20 En una realización, el procedimiento médico es una cirugía vascular. Una cirugía vascular se refiere a una operación que implica una estructura vascular, tal como el corazón o un vaso sanguíneo. Ejemplos de cirugías vasculares incluyen, pero no se limitan a, cirugía cardiopulmonar, por ejemplo, injerto de una derivación en la arteria coronaria; o injerto en una arteria cardíaca sin derivación cardiopulmonar; reemplazo o reparación de una válvula cardíaca, incluyendo, por ejemplo, la válvula aórtica o mitral, valvulotomía o valvuloplastia aórtica o mitral; trasplante de corazón; operación para mejorar un estado de estenosis o regurgitación; operación que implica un marcapasos, incluyendo un marcapasos temporal o permanente, marcapasos biventricular; operación que implica un cambio de generador, una extracción de derivaciones o un monitor cardíaco implantable, un dispositivo cardioversor/desfibrilador implantado, o un dispositivo mecánico para favorecer la circulación, por ejemplo, una bomba extracorpórea o un dispositivo de asistencia ventricular; endarterectomía carotídea; tromboendarterectomía; aneurisma aórtico y cirugía de disección; procedimiento de acceso a diálisis, tal como fistulas arterio-venosas; cirugía que implica un tumor cardíaco o una lesión cardíaca traumática; y cirugía reconstructiva o cualquier otro tipo de cirugía vascular conocida actualmente o en el futuro.

Una cirugía vascular puede implicar, por ejemplo, una operación correctora de un defecto cardíaco congénito. Las cirugías correctoras de defectos cardíacos congénitos incluyen, pero no se limitan a, una operación para reparar una malformación o un defecto, por ejemplo, la reparación de un defecto del septo atrial o ventricular; reparación de un conducto arterioso permeable; reparación de una derivación; reparación de una coartación aórtica; reparación de un retorno venoso pulmonar anómalo total o parcial; corrección de un intercambio venoso de una transposición completa de las grandes arterias o cirugía intraventricular; reparación de la tetralogía de Fallot; o cualquier otro tipo de cirugía conocida actualmente o en el futuro para un defecto cardíaco congénito.

40 En una realización, el procedimiento médico comprende el uso de un catéter. Tal como se utiliza en este documento, el término "catéter" se refiere a un tubo que se inserta en un vaso sanguíneo. Ejemplos de procedimientos que implican el uso de un catéter incluyen, pero no se limitan a, la colocación de una prótesis endovascular en un vaso, tal como una arteria coronaria, colocación de una prótesis endovascular en la arteria carótida, colocación de una prótesis endovascular intracraneal, arteria aorta o arteria ilíaca; angioplastia, tal como angioplastia con balón; trombetomía; trombólisis dirigida por catéter; embolización, administración directa o local de quimioterapia o calor; reemplazo o reparación de una válvula cardíaca; valvulotomía o valvuloplastia aórtica o mitral. En una realización, el procedimiento médico implica cualquier uso de un catéter o una prótesis endovascular o un procedimiento que implica la disección o el pinzamiento de un vaso. Un procedimiento vascular puede implicar tomar una muestra de un vaso, tal como una oclusión endovascular con bobina, una oclusión endovascular con aneurisma o toma de muestras de un vaso intracraneal con aplicación de cuerpos extraños (por ejemplo, espirales de platino).

En una realización, un procedimiento médico comprende la formación de imágenes. La formación de imágenes se puede utilizar para visualizar procesos biológicos y celulares *in vivo*, y se puede utilizar para la detección, el diagnóstico, la evaluación, el seguimiento o el tratamiento de una afección, enfermedad o trastorno. La formación de imágenes puede implicar o no el uso de un catéter. Las técnicas de formación de imágenes pueden tomar imágenes del sistema vascular, tales como angiografía coronaria, incluyendo la angiografía de diagnóstico o la angiografía basada en catéter, incluyendo la observación de la vasculatura coronaria, la vasculatura pulmonar o la vasculatura de cualquier parte del cuerpo, o aortograma.

En una realización, el procedimiento médico comprende la administración de un agente de contraste, un radioisótopo o un colorante. Para una explicación de las modalidades de formación de imágenes y los agentes de contraste usados comúnmente, véase Pysz MA et al. 65 *Clinical Radiology* 500-516, 2010; ejemplos de agentes de contraste y

diversas técnicas de formación de imágenes se proporcionan a continuación.

Por ejemplo, los agentes de contraste utilizados en CT incluyen, pero no se limitan a, bario, yodo, criptón y xenón. Los agentes de contraste utilizados en tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT-CT) incluyen, pero no se limitan a, ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , ^{177}Lu . Agentes de contraste comunes utilizados en la tomografía de emisión de positrones (PET) incluyen, pero no se limitan a los isótopos, ^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga . Los agentes de contraste usados en IRM incluyen, pero no se limitan a, gadolinio (Gd^{3+}), partículas de óxido de hierro (SPIO, USPIO), óxido de manganeso y ^{19}F . Los agentes de contraste utilizados en la espectroscopia de resonancia magnética (RMS) incluyen, pero no se limitan a, colina, creatina, lactato, lípidos, poliaminas y N-acetil-aspartato. Las microburbujas de contraste se pueden utilizar en ultrasonidos (US), como por ejemplo, microperlas rellenas de gas (p. ej., perfluorobutano) o burbujas con recubrimiento de lípido. Moléculas fluorescentes, colorantes y/o partículas que absorben luz se pueden utilizar en técnicas de formación de imágenes ópticas. Los radiotrazadores se pueden usar en la formación de imágenes oncológicas, cardiovasculares o neurológicas, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{111}In , ^{99m}Tc , ^{90}Y , ^{131}I , ^{123}I / ^{131}I y ^{153}Sm . Sondas fluorescentes "inteligentes" activadas con captosina B o MMP2/9 se pueden utilizar en tomografía óptica. Los agentes de contraste que incluyen colorantes NIRF, puntos cuánticos y nanopartículas con propiedades de dispersión de Raman de superficie mejorada (SERS), se pueden utilizar en espectroscopia Raman. Otras técnicas de formación de imágenes pueden incluir ecocardiografía (ECHO) con contraste, como microburbujas, incluyendo ECHO bidimensional, ecocardiograma de estrés, ECHO Doppler y ECHO transesofágico. Las técnicas de formación de imágenes pueden incluir microscopía, formación de imágenes fotoacústicas o cualquier otra modalidad de formación de imágenes moleculares actualmente conocida o por conocer y/o agentes de contraste asociados. La formación de imágenes moleculares puede implicar la administración de microperlas (incluyendo microperlas y micropartículas) y nanopartículas que están unidas a un tejido o a un marcador específico de una enfermedad, o se fijan a un candidato terapéutico para una administración dirigida.

Los inhibidores de FXII se pueden administrar a un paciente antes, durante y/o después de un procedimiento médico. Los inhibidores de FXII se pueden administrar al cabo de 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 o 96 horas o más antes, durante y/o después de un procedimiento médico. Los inhibidores de FXII se pueden administrar en una sola dosis, o en dosis múltiples, o repetidamente en intervalos de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 o 48 horas o más antes, durante y/o después de un procedimiento médico. Los inhibidores de FXII también se pueden administrar como una infusión continua durante 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 o 96 horas o más antes, durante y/o después de un procedimiento médico. Debido a la propiedad ventajosa de no aumentar el riesgo de hemorragia, el inhibidor de FXII se puede administrar antes, durante y/o después del procedimiento médico. Los tiempos óptimos de administración pueden ser determinados para cada procedimiento particular en ensayos clínicos. El momento de la administración también puede depender de factores tales como el tipo de procedimiento o el estado individual del paciente, incluyendo el historial del paciente, la o las enfermedades subyacentes y/o el uso de otros medicamentos, y puede ser determinado por el profesional sanitario.

III. Inhibidores de FXII

Como se ha descrito anteriormente, "FXII" se refiere a uno cualquiera de Factor XII y Factor XII activado (FXIIa) o a ambos. Por tanto, "inhibidor de FXII" incluye inhibidores de uno cualquiera de FXII y FXIIa o de ambos. Además, los anticuerpos anti-FXII incluyen anticuerpos que se unen e inhiben uno cualquiera de FXII y FXIIa o ambos. La expresión "inhibidor de FXII" también se entiende que incluye un inhibidor de FXII que está ligado a un polipéptido que prolonga la semivida el cual, en una realización, incluye un enlazador.

En una realización, el inhibidor de FXII/FXIIa es un inhibidor específico de FXII/FXIIa, preferiblemente un inhibidor específico de FXIIa.

Un inhibidor específico de FXII/FXIIa se refiere a un inhibidor que inhibe proteasas de serina plasmáticas distintas de FXII y/o FXIIa, menos o igual a un 25%, si se utiliza en una relación molar de 1:1. En otras palabras: un inhibidor específico de FXII/FXIIa inhibe proteasas de serina plasmáticas distintas de FXII y/o FXIIa menos o igual a un 25%, cuando dicho inhibidor se utiliza en una relación molar de 1:1 entre la respectiva proteasa de serina plasmática y dicho inhibidor. Por ejemplo, un AcMo específico de FXII/FXIIa inhibe la proteasa de serina plasmática FXIa solo un 5%, en donde la relación molar entre FXIa y dicho AcMo es 1:1, mientras que el mismo AcMo de FXII/FXIIa inhibe FXIIa al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%.

En una realización de la invención, otra proteasa de serina plasmática es inhibida en más de un 50% si se utiliza en una relación molar de 1:1 entre la respectiva proteasa de serina plasmática y dicho inhibidor.

En otra realización de la invención, otras dos proteasas de serina plasmáticas son inhibidas en más de un 50% si se utilizan en una relación molar de 1:1 entre la respectiva proteasa de serina plasmática y dicho inhibidor.

En aún otra realización, el inhibidor de FXII/FXIIa es un inhibidor de FXII/FXIIa humano, que incluye un anticuerpo monoclonal humanizado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal completamente humanizado.

A. Infestina-4

En una realización, la solicitud proporciona un inhibidor de FXII que comprende el dominio 4 de Infestina, Infestina-4.

En una realización, un inhibidor de FXII comprende una variante de Infestina-4. En otra realización, los inhibidores de FXII comprenden el dominio 4 de Infestina, y opcionalmente los dominios 1, 2 y/o 3 de Infestina; estas proteínas son conocidas por ser potentes inhibidores de FXII (véase el documento WO 2008/098720; véase también Campos ITN et al. 577 FEBS Lett. 512-516, 2004). La secuencia del polipéptido de tipo silvestre de Infestina-4 se proporciona (SEQ ID NO: 1). Tal como se utiliza en este documento, el término "variante" se refiere a un polipéptido con una mutación de aminoácido, en donde una "mutación" se define como una sustitución, una delección o una adición, a la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, en donde tales cambios no alteran la capacidad funcional del polipéptido para inhibir FXII. El término "variante" incluye fragmentos de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre o mutada. Otros ejemplos de tales variantes se proporcionan a continuación.

En una realización, una variante de Infestina-4 comprende los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre (véase la secuencia subrayada en la Figura 2), y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácidos al margen de los aminoácidos N-terminales, lo que da lugar a diferencias con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, o seis residuos de cisteína conservados (véanse los aminoácidos en negrita en la Figura 2) y una homología de al menos 70% con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre. Los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 pueden ser importantes para la unión al FXII, basándose en el análisis de datos estructurales para un inhibidor relacionado, *Rhodnius prolixus* (PDB: 1 TSO) que se une a la trombina, y el análisis de la unión de SPINK-1 a la quimotripsina, ya que ambos comparten una característica común de la acumulación de sitios de contacto en la región N-terminal, como se muestra en la Figura 1. Por lo tanto, en una realización, una variante de Infestina-4 comprende la región N-terminal conservada de los aminoácidos 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácidos al margen de estos aminoácidos N-terminales conservados, lo que da lugar a diferencias con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre. Una mutación puede ser una sustitución, una delección o una adición. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "al margen de dichos aminoácidos N-terminales" se refiere a cualquier aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica de la variante que no sea el tramo de aminoácidos contiguos que comprende la secuencia VRNPCACFRNYV, es decir, los aminoácidos 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre. En otra realización, una variante de Infestina-4 comprende seis residuos de cisteína conservados y tiene una homología de al menos 70% con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre. En una realización, los seis residuos de cisteína conservados son los aminoácidos en las posiciones 6, 8, 16, 27, 31 y 48 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre (véase la Figura 2). En una realización, la variante comprende la cisteína final conservada. En otras realizaciones, las posiciones exactas de los residuos de cisteína, y las posiciones relativas entre sí, pueden cambiar desde las posiciones 6, 8, 16, 27, 31 y 48 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, debido a inserciones o delecciones en la variante de Infestina-4. Sin embargo, en estas realizaciones, una variante de Infestina-4 comprende las seis cisteínas y puede compartir 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre.

En realizaciones, una variante de Infestina-4 se caracteriza porque inhibe FXII. La actividad funcional de la inhibición de FXII se puede determinar, por ejemplo, a través de una caracterización *in vitro* y/o *in vivo*, incluyendo ensayos directos para someter a ensayo la inhibición de la actividad de la enzima FXII, el tiempo de coagulación prolongado, es decir, el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), o métodos *in vivo* para evaluar la coagulación. Otros ejemplos de variantes de Infestina-4 son mutantes de SPINK-1, que se describen a continuación.

40 B. Mutantes de SPINK-1

La descripción también implica inhibidores de FXII para uso terapéutico en seres humanos. Se puede emplear una proteína humana con una similitud muy alta con Infestina-4. Por ejemplo, la proteína humana con la mayor similitud con Infestina-4 es SPINK-1, un inhibidor de la proteasa de serina de tipo Kazal, expresado en el páncreas (también conocido como inhibidor de la tripsina secretora pancreática, PSTI). La familia de inhibidores de la proteasa de serina de tipo Kazal es una de las numerosas familias de inhibidores de proteasa de serina. Se han descrito muchas proteínas de diferentes especies (Laskowski M y Kato I, 49 Ann. Rev. Biochem. 593-626, 1980). Las similitudes en la secuencia de aminoácidos entre Infestina-4 y SPINK-1 se indican en la Figura 2.

Basándose en la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) se pueden generar diferentes variantes con el fin de aumentar la homología de la secuencia de SPINK-1 con Infestina-4. La expresión "una homología incrementada con Infestina-4" se refiere al proceso mediante el cual se realizan mutaciones de aminoácidos en SPINK-1 para hacer que la secuencia de SPINK-1 se parezca más a la secuencia Infestina-4.

En una realización, SPINK-1 está mutada para comprender los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre; la secuencia del polipéptido se proporciona y se conoce como K1 (SEQ ID NO: 3). Como se ha descrito anteriormente, se cree que la porción N-terminal de la secuencia de Infestina-4 es importante para la función inhibidora de FXII.

Por lo tanto, en una realización, una variante de SPINK-1 mutada también comprende los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre, y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácidos al margen de dichos aminoácidos N-terminales, lo que da lugar a diferencias entre la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre e incrementa la homología de la variante con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre. En otra realización, una variante de SPINK-1 mutada comprende seis residuos de cisteína conservados y tiene una homología de

al menos un 70% con la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre. Una mutación puede ser una sustitución, una delección o una adición. Como se ha definido anteriormente, la expresión "al margen de dichos aminoácidos N-terminales" se refiere a cualquier aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica de la variante que no sea el tramo de aminoácidos contiguo que se compone de la secuencia VRNPCACFRNYV, es decir, los aminoácidos 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre. El término "variante" incluye fragmentos de dicha secuencia de SPINK-1 mutada. En una realización, los seis residuos de cisteína conservados pueden ser aminoácidos en las posiciones 9, 16, 24, 35, 38 y 56 de la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre (véase la Figura 2). En una realización, la variante comprende la cisteína final conservada. En otra realización, las posiciones exactas de las cisteínas, y las posiciones relativas entre sí, pueden cambiar desde las posiciones 9, 16, 24, 35, 38 y 56 de la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre debido a inserciones o deleciones en la variante de SPINK-1. Sin embargo, en estas realizaciones, una variante de SPINK-1 comprende las seis cisteínas. En realizaciones, una variante de SPINK-1 también se caracteriza porque inhibe FXII.

Se proporcionan ejemplos de tales variantes de SPINK-1 y se denominan K2 y K3 (SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente). En las variantes de SPINK-1 K2 y K3, se realizan sustituciones adicionales de aminoácidos fuera del extremo N-terminal, con el fin de aumentar la homología con Infestina-4, en donde las variantes también se caracterizan porque inhiben la actividad de FXII. Véase el documento WO 2008/098720. La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de estas variantes y el grado de cambios con la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre. En el caso de la variante K3 de SPINK-1, se realizaron cinco sustituciones de aminoácidos para aumentar la homología con Infestina-4. Por tanto, en realizaciones, una variante de SPINK-1 puede compartir 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la secuencia de SPINK-1 de tipo silvestre.

C. Otros inhibidores de FXII.

En una realización, otros inhibidores de FXII se administran a un paciente que recibe un procedimiento médico. Como se ha descrito anteriormente, la expresión inhibidores de FXII incluye inhibidores de cualquiera de FXII y FXIIa o de ambos. En el documento WO2006/066878 se propone el uso de anticuerpos contra FXII o el uso de inhibidores de FXII. Específicamente, los inhibidores de FXII incluyen antitrombina III (AT III), inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, inhibidor de C1, aprotinina, inhibidor de la proteasa alfa-1, antipaína ([*(S)*-1-carboxi-2-feniletil]carbamoil-L-Arg-L-Val-arginal), acetato de Z-Pro-Pro-aldehído-dimetilo, DX88 (Dyax Inc., 300 Technology Square, Cambridge, MA 02139, EE.UU.; citado en: Williams A y Baird LG, 29 Transfus Apheresis Sci. 255-258, 2003), leupeptina, inhibidores de prolil oligopeptidasa tales como Fmoc-Ala-Pyr-CN, inhibidor de tripsina de maíz (CTI), mutantes del inhibidor de la tripsina pancreática bovina, ecotina, proteína anticoagulante de la limanda japonesa, inhibidor V de la tripsina de Cucurbita maxima incluyendo iso-inhibidores de Cucurbita máxima y Hamadarina (como se describen en Isawa H et al. 277 J. Biol. Chem. 27651-27658, 2002) y Pro-Phe-Arg-clorometil-cetona (PCK).

El inhibidor de FXII puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo o un mimético que conserva la actividad inhibidora, por ejemplo, análogos del dominio inhibidor de la proteasa Kunitz de una proteína precursora amiloide, como se describe en el documento de patente de EE.UU. nº 6.613.890 en las columnas 4 a 8. Otros inhibidores adecuados pueden ser Hamadarina, como se describe en Isawa H et al. 277 J. Biol. Chem. 27651-27658, 2002. Un inhibidor adecuado de la tripsina de maíz y métodos para su producción se describen en Chen Z et al. 65 Applied and Environmental Microbiology, 1320-1324, 1999, y en Wen L et al. 18 Plant Mol. Biol. 813-814, 1992.

En otra realización, el inhibidor de FXII puede ser un anticuerpo anti-FXII que se une al FXII e inhibe la activación y/o la actividad de FXII. Tal anticuerpo se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO 2006/066878, y en Ravon et al., 1 Blood 4134-43, 1995. Como se ha descrito anteriormente, un "anticuerpo anti-FXII" incluye anticuerpos que se unen e inhiben uno cualquiera de FXII y FXIIa o ambos. Los anticuerpos anti-FXII se describen con más detalle a continuación.

D. Inhibidores de FXII ligados a polipéptidos que mejoran la semivida

Otro aspecto de la solicitud proporciona inhibidores de FXII ligados a un polipéptido que mejora la semivida (HLEP). En una realización, los inhibidores de FXII son proteínas pequeñas. Por lo tanto, se puede esperar un aclaramiento renal rápido según lo publicado para otras proteínas pequeñas (Werle M y Bernkop-Schnurch A, 30 Amino Acids 351-367, 2006). Una manera de abordar una semivida plasmática corta de un compuesto polipeptídico es inyectarlo repetidamente o mediante infusión continua. Otro enfoque es aumentar la semivida plasmática intrínseca del polipéptido en sí. Por ejemplo, en una realización, los inhibidores de FXII están ligados a proteínas que prolongan la semivida.

Un "polipéptido que mejora la semivida" incrementa la semivida del inhibidor de FXII *in vivo* en un paciente o en un animal. Por ejemplo, la albúmina y las inmunoglobulinas y sus fragmentos o derivados se han descrito como polipéptidos que mejoran la semivida (HLEPs). Ballance et al. (documento WO 2001/79271) describía polipéptidos de fusión de una multitud de diferentes polipéptidos terapéuticos que, cuando se fusionan con seroalbúmina humana, se predice que tienen una semivida funcional prolongada *in vivo* y una vida útil extendida.

Los términos "albúmina" y "seroalbúmina" incluyen la albúmina humana (HA) y variantes de la misma, cuya forma

madura completa se proporciona (SEQ ID NO: 6), así como albúminas de otras especies y variantes de las mismas. Tal y como se usa en este documento, "albúmina" se refiere a una secuencia polipeptídica o de aminoácidos de albúmina, o a una variante de la albúmina, que tiene una o varias actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. Tal y como se emplea en la presente memoria, la albúmina es capaz de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica de un inhibidor de FXII. La albúmina se puede obtener a partir de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, mono, vaca, oveja o cerdo. Albúminas de animales no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, albúmina de gallina y salmón. La porción de albúmina del polipéptido ligado a albúmina puede ser de un animal diferente de la porción de polipéptido terapéutico. Véase el documento WO 2008/098720 para ejemplos de proteínas de fusión de albúmina.

En una realización, una variante de la albúmina tiene al menos 10, 20, 40 o al menos 70 aminoácidos de longitud o puede incluir 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos procedentes de la secuencia de HA (SEQ ID NO 6) o puede incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de la HA. Una variante de la albúmina puede incluir una sustitución, delección o adición de aminoácidos, ya sea una sustitución conservadora o no conservadora, en donde tales cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o el dominio activo que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos que mejoran la semivida. Estas variantes pueden compartir 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología.

En una realización, la variante de la albúmina incluye fragmentos y puede consistir o comprender alternativamente al menos un dominio completo de la albúmina o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO 6), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO 6), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO 6), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO 6), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO 6) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO 6 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO 6). Cada dominio está a su vez compuesto por dos subdominios homólogos, a saber, 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, en donde las regiones de enlazadores flexibles entre los subdominios comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

En otra realización, otras proteínas que están estructural o evolutivamente relacionadas con la albúmina se pueden utilizar como HLEPs, incluyendo, pero no limitadas a alfa-fetoproteína (documento WO 2005/024044; Beattie y Dugaiczky, 20 Gene 415-422, 1982), afamina (Lichenstein et al. 269 J. Biol. Chem. 18149-18154, 1994), y la proteína que se une a vitamina D (Cooke y David, 76 J. Clin. Invest. 2420-2424, 1985). Sus genes representan un grupo de multigenes con similitudes estructurales y funcionales que se cartografían en la misma región cromosómica en los seres humanos, ratones y ratas. La similitud estructural de los miembros de la familia de la albúmina sugiere su utilidad como HLEPs. Por ejemplo, se ha reivindicado que la alfa-fetoproteína prolonga la semivida de un polipéptido terapéutico fijado *in vivo* (documento WO 2005/024044). Tales proteínas, o variantes de las mismas, que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica, se pueden utilizar, y se pueden obtener a partir de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, mono, vaca, oveja o cerdo, o un no mamífero, incluyendo pero no limitados a, gallina o salmón. Véase el documento WO 2008/098720. Tales variantes pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de la proteína respectiva o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de las respectivas proteínas. Las proteínas de fusión de los miembros de la familia de la albúmina pueden incluir variantes polimórficas de origen natural.

En otra realización, una inmunoglobulina (Ig), o variantes de la misma, se pueden utilizar como un HLEP, en donde una variante incluye fragmentos. En una realización, se emplea el dominio Fc o porciones de la región constante de la inmunoglobulina. La región constante puede ser la de una inmunoglobulina IgM, IgG, IgD, IgA o IgE. La porción de polipéptido terapéutico está conectada a la Ig a través de la región bisagra del anticuerpo o un enlazador peptídico, que puede ser escindible. Varias patentes y solicitudes de patente describen la fusión de proteínas terapéuticas con regiones constantes de inmunoglobulinas para extender la semivida de la proteína terapéutica *in vivo* (documentos US 2004/0087778, WO 2005/001025, WO 2005/063808, WO 2003/076567, WO 2005/000892, WO 2004/101740, US 6.403.077). Por ejemplo, un Fc fusionado a la citocina IFN- β conseguía mejorar la actividad biológica de IFN- β , prolongaba la semivida en circulación y tenía una mayor solubilidad (documento WO 2006/000448). Por lo tanto, otra realización es emplear tales secuencias de inmunoglobulina, por ejemplo, fragmentos Fc de inmunoglobulinas y variantes de los mismos, como HLEPs. Los inhibidores de FXII se pueden fusionar a dominios Fc o al menos a porciones de regiones constantes de inmunoglobulinas como HLEPs y pueden ser producidos como moléculas recombinantes en células hospedadoras procariontas o eucariotas, tales como bacterias, levaduras, plantas, animales (incluyendo los insectos) o líneas celulares humanas o en animales transgénicos (documento WO 2008/098720). Una proteína de fusión SPINK-K2-Fc se muestra a modo de ejemplo en SEQ ID NO: 7.

E. Enlazadores

En una realización, un enlazador peptídico intercalado se puede introducir entre el polipéptido terapéutico y el HLEP. En una realización, se introduce un enlazador escindible, particularmente si el HLEP interfiere con la actividad específica del polipéptido terapéutico, por ejemplo, por impedimento estérico. En ciertas realizaciones, el enlazador es escindido por enzimas tales como proteasas de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, extrínseca o común. Las proteasas de coagulación de la vía intrínseca son proteasas en la vía de activación por contacto, incluyendo, por ejemplo, FXIIa, FXIa o FIXa. En una realización, el enlazador es escindido por FXIIa. Las proteasas de la vía extrínseca incluyen proteasas en la vía del factor tisular, por ejemplo, FVIIa. Las proteasas de la vía común in-

cluyen proteasas implicadas en la conversión del fibrinógeno a fibrina, por ejemplo, FXa, FIIa y FXIIIa.

F. Formulación terapéutica y administración

El inhibidor de FXII o una variante del mismo puede tener una pureza superior al 80%, o superior al 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En una realización, la variante puede tener un estado farmacéuticamente puro que es superior al 99,9% de pureza, con respecto a macromoléculas contaminantes, tales como otras proteínas y ácidos nucleicos, y estar exenta de agentes infecciosos y pirógenos.

El inhibidor de FXII purificado se puede disolver en soluciones tampón acuosas, convencionales fisiológicamente compatibles a las que se puede añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de SBI en un paciente. Tales vehículos y excipientes farmacéuticos, así como formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Kibbe et al. Handbook of Pharmaceutical Excipients, (3ª ed., Pharmaceutical Press), 2000. La composición farmacéutica se puede formular en forma liofilizada o soluble estable. El polipéptido se puede liofilizar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes del uso mediante la adición de uno o varios diluyentes farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones del inhibidor de FXII se entregan al paciente a través de cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen diversos sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar la composición a través de cualquier vía conveniente. Las composiciones se pueden administrar sistémicamente, tal como de forma parenteral. El término "parenteral" tal y como se emplea en este documento, incluye una inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial e intraqueal, instilación, aplicación por pulverización y técnicas de infusión. Las formulaciones parenterales se pueden administrar por vía intravenosa, ya sea en forma de bolo o como una infusión constante, o de forma subcutánea, de acuerdo con procedimientos conocidos. Los vehículos líquidos preferidos, que son bien conocidos para uso parenteral, incluyen agua estéril, solución salina, dextrosa acuosa, soluciones de azúcar, etanol, glicoles y aceites. Para el uso sistémico, las proteínas terapéuticas se pueden formular para una línea intravenosa o una línea arterial. Las formulaciones se pueden administrar continuamente mediante infusión o mediante inyección de bolo. Algunas formulaciones incluyen sistemas de liberación lenta. En una realización, la formulación se administra como un parche. Los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes o agentes humectantes, etc. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes, elixires o similares, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado para el uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes.

La dosis de inhibidor de FXII puede depender de muchos factores, tales como, por ejemplo, la indicación, la formulación o el modo de administración y se puede determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva. La dosis de inhibidor de FXII se puede administrar a un paciente antes, durante y/o después de un procedimiento médico. En una realización, el inhibidor de FXII se puede administrar 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 o 96 horas antes, durante y/o después de un procedimiento médico. Un inhibidor de FXII se puede administrar en una sola dosis o en dosis múltiples, como una infusión continua durante un período de tiempo de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 o 48 horas, o repetidamente en intervalos de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 o 48 horas antes, durante y/o después de un procedimiento médico. Debido a la propiedad ventajosa de no incrementar el riesgo de hemorragia, en una realización, el inhibidor de FXII se administra durante el procedimiento. La composición farmacéutica se puede administrar sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden coformular o se pueden administrar como formulaciones distintas, bien simultáneamente o por separado y a través de la misma vía de administración o diferentes vías de administración. La pauta de administración o la dosis de un inhibidor de FXII también puede variar entre pacientes individuales con la misma indicación o indicaciones diferentes, dependiendo de factores tales como otras afecciones o terapias médicas.

IV. Modelo animal de SBI

Un aspecto de la descripción se refiere a un modelo animal de isquemia que imita los mecanismos heterogéneos y los orígenes de un émbolo, que puede conducir a una lesión isquémica en al menos un órgano diana. En una realización, el modelo animal comprende un procedimiento, en donde el procedimiento comprende la liberación de al menos un émbolo en el sistema arterial de un animal, lo que podría dar lugar a una lesión isquémica en al menos un órgano diana, en donde el órgano diana es el cerebro, el corazón, el riñón, el hígado y/o un órgano del tracto gastrointestinal (incluyendo el esófago, el estómago, el intestino delgado y/o el intestino grueso (incluyendo colon y/o recto) y además en donde, si el órgano diana es el cerebro, la lesión isquémica se caracteriza por ser clínicamente silente y/o el émbolo no es trombolizable. En una realización, el órgano diana es el cerebro. En una realización, el animal se evalúa para estudiar una indicación de una lesión isquémica en el cerebro que es clínicamente silente. En ciertas realizaciones, el animal recibe también un candidato terapéutico para someter a ensayo la capacidad del candidato terapéutico para reducir una lesión isquémica en el órgano diana. La expresión "clínicamente silente" se ha definido anteriormente. En esta realización, los ratones se evaluaron clínicamente para determinar si una lesión isquémica en el cerebro es "clínicamente silente", es decir, el animal se evalúa para determinar déficits agudos, de

comportamiento manifiesto o motores, asociados con un accidente cerebrovascular. Los indicadores de accidente cerebrovascular, incluyen, pero no se limitan a, discinesia, letargo, agarre, debilidad en las extremidades, caída del párpado, trastorno de la marcha, caminar en círculos y revolcarse. Un animal que no presenta síntomas similares al accidente cerebrovascular después de la administración de un émbolo, puede tener una lesión isquémica en el cerebro que es clínicamente silente.

El modelo animal también implica la evaluación del animal para estudiar una indicación de una lesión isquémica en el cerebro. En una realización, la evaluación implica la formación de imágenes. Una "indicación" de lesión isquémica puede ser evidente para un experto en la técnica mediante la evaluación de imágenes del cerebro. Por ejemplo, una lesión isquémica que se traduce en daños en los tejidos puede ser evidente por cambios físicos en la apariencia del tejido en las imágenes cerebrales, o por una evidencia de inflamación, coagulación o edema en un área del cerebro o alrededor de la misma. Por ejemplo, se puede utilizar IRM de difusión ponderada (DWI) para visualizar una lesión isquémica, ya que la difusión de las moléculas difiere en el tejido lesionado y alrededor del mismo.

El modelo animal se considera que es un modelo no terapéutico, a saber, que es una herramienta de investigación para evaluar el impacto clínico de un émbolo. En este modelo, un émbolo se libera intencionadamente en el animal con la intención de causar isquemia, y un émbolo de este tipo crearía una lesión isquémica si no se tomaran otras medidas. En otras palabras, la salud del animal y el bienestar no se mejora con el procedimiento y por lo tanto no se puede considerar que sea un agente terapéutico, ni se puede considerar que sea un procedimiento quirúrgico beneficioso. El animal es sacrificado durante el proceso de evaluación o al concluir la evaluación. Sin embargo, en una realización, el modelo animal puede ser útil para la evaluación de un candidato terapéutico para el tratamiento de la isquemia. En estas realizaciones, aunque un candidato terapéutico puede tener un resultado terapéutico en el modelo animal, es el candidato terapéutico y no el modelo animal, el que se considera que es terapéutico.

A. Animales

El modelo animal se caracteriza además porque el animal puede ser un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, un ratón, rata, conejo, gato, perro, cerdo o mono. Por ejemplo, el animal puede ser un ratón o una rata. El animal puede ser macho o hembra y tener cualquier edad. Ejemplos de cepas murinas que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, BALB/c, C57/BL6, C57/CL10J, CBA/J, DBA/J, FVB/J, C3H/HeJ, A/J, AKR/J, 129S1/SvImJ, 129X1/SvJ, NOD, SJL, TALLYJO/JngJ, MRL, NZW, subcepas y cepas híbridas. Ejemplos de cepas de ratas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, ratas CD, Wistar, Fisher, Sprague Dawley, BBDP, Long-Evans, Zucker, Hairless, y subcepas y cepas híbridas.

En una realización, el animal del modelo animal se modifica, tal como un animal modificado genéticamente o un animal que ha sido alterado de otro modo, como mediante un procedimiento o administración de una sustancia. Un animal modificado genéticamente puede tener uno o varios genes desactivados o activados, o uno o varios genes que están desactivados o activados de forma condicional. El animal se puede caracterizar porque se utiliza como modelo para otra enfermedad. Por ejemplo, un animal puede ser susceptible de otra enfermedad debido al trasfondo genético, o debido a la recepción de un agente o un procedimiento que induce una enfermedad o un estado alterado (por ejemplo, una enfermedad autoinmune, tal como en los ratones NOD, o en EAE inducida por MOG). Puede ser de interés utilizar el modelo animal para estudiar SBI en tales contextos de estados modificados o de enfermedad.

B. Émbolo

En una realización de la invención como se describe, un émbolo no trombolizable se administra a un animal para imitar al menos un émbolo que se puede introducir durante un procedimiento médico. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "no trombolizable" se refiere a un émbolo que no se lisa con fármacos trombolíticos (es decir, el émbolo no está compuesto por sangre). En estas realizaciones, el procedimiento libera un émbolo que no es un trombo. Ejemplos de un émbolo no trombolizable incluyen, pero no se limitan a, burbujas, aceite, grasa, colesterol y/o residuos, ya que estos émbolos no se lisan con fármacos trombolíticos.

En una realización, un émbolo es una solución de microburbujas que imita agentes de contraste utilizados en las técnicas de formación de imágenes como la ecografía. Los capilares y las arteriolas en el cerebro se pueden ocluir de este modo de una manera difusa en lugar de con una distribución focal.

En una realización, se utiliza una microperla para imitar un émbolo no lisible y se caracteriza porque la administración no da lugar a síntomas similares a un accidente cerebrovascular manifiesto. El término "microperla" incluye microperlas y otras micropartículas (por ejemplo, una micropartícula que no tiene una forma uniformemente esférica). En una realización, una microperla se utiliza para imitar un émbolo no trombolizable. El tamaño de la microperla puede ser, por ejemplo, cualquier tamaño desde 20-200 μm , 25-100 μm o 30-50 μm . La cantidad de microperlas administradas puede ser 500 o 1000 o 2000 microperlas, incluyendo cualquier cantidad desde 500-600, 500-700, 500-800, 500-900, 500-1000 y 500-2000 microperlas. El número de microperlas puede variar dependiendo del tamaño del animal, del tipo y del tamaño de la microperla, y otros factores experimentales. Una microperla puede estar formada por materiales naturales o sintéticos, incluyendo, pero no limitados a, poliestireno, polietileno u otros polímeros, látex, vidrio, cerámica, metal, puntos cuánticos o material paramagnético. En una realización, la microperla es fluorescente, lo que puede permitir el seguimiento de los materiales embólicos. Los colorantes fluorescentes

incluyen, pero no se limitan a, cumarina, fluoresceína, rodamina o ficoeritrina, o conjugados de los mismos. Las microperlas se pueden teñir internamente o conjugar con un colorante fluorescente. Una ventaja de usar microperlas para la administración es que se pueden normalizar fácilmente, en donde el tamaño y la cantidad de microperlas se pueden cuantificar y la cantidad administrada se puede mantener constante en múltiples animales.

5 En otra realización, un émbolo se administra a un animal, en donde el émbolo comprende sangre coagulada. La sangre coagulada se puede reducir a pequeños fragmentos, usando técnicas tales como homogeneización de tejido o tratamiento con ultrasonidos. La fuente de la sangre coagulada puede ser la sangre del mismo animal que recibe la administración, o de un animal de la misma cepa o especie, o de un animal de una cepa o especie diferente que el animal que recibe la administración. La coagulación se puede inducir usando reactivos de coagulación conocidos, tales como CaCl_2 , trombina o trombina humana. En una realización, la sangre coagulada se vuelve fluorescente, por ejemplo, mediante el uso de un agente de contraste o un agente de acumulación de sangre, tal como un agente de acumulación de sangre próximo al infrarrojo.

15 En otra realización, un émbolo se libera en el sistema arterial de un animal utilizando un catéter. En otra realización, un émbolo se libera en el sistema arterial de un animal debido a un procedimiento que comprende pinzamiento y/o cirugía.

C. Procedimiento

En una realización de la invención tal como se describe, al menos un émbolo se inyecta en el sistema arterial de un animal. El émbolo se puede inyectar en cualquier arteria, incluyendo la aorta, el arco aórtico, la arteria carótida, una arteria coronaria, la arteria braquiocefálica, la circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal, una arteria hepática, una arteria mesentérica y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón.

En una realización, el émbolo se inyecta en una arteria carótida. En una realización, una arteria se pinza. En ciertas realizaciones, una ligadura temporal se liga alrededor de una arteria, tal como alrededor de una arteria carótida. En una realización, el émbolo se puede administrar a través de una inyección intracardiaca, pero este enfoque tiene varias desventajas. En esta realización, el émbolo se distribuye por todo el animal, haciendo que la normalización sea más difícil porque no está claro cuántos émbolos se alojan en el cerebro. Además, la mortalidad del procedimiento es alta, y puede que no esté claro si la inyección se había realizado correctamente. En ciertas circunstancias, una inyección intracardiaca puede ser útil para la evaluación de una isquemia en los órganos diana, por ejemplo, corazón, riñón, hígado y/o un órgano del tracto gastrointestinal, incluyendo el esófago, el estómago, el intestino delgado y/o el intestino grueso (incluyendo colon y/o recto).

En una realización, se emplea un tubo o un catéter para administrar el émbolo. El catéter puede ser un catéter arterial. Un catéter puede estar formado por polietileno, poliuretano u otros polímeros o materiales. El catéter puede tener un tamaño adecuado para el sitio de la inyección y para el tamaño del animal. Un catéter se puede modificar para ayudar a la inyección del émbolo, por ejemplo, un catéter se puede modificar mediante el estiramiento del tubo para lograr manualmente un catéter más estrecho, más delgado o puntiagudo, adecuado para el uso en un animal de laboratorio pequeño. En una realización, se utiliza una aguja de inyección, en donde un experto en la técnica puede inyectar técnicamente un émbolo en el sistema arterial de un animal.

D. Evaluación

En realizaciones de la invención tal como se describe, el modelo animal comprende una etapa de evaluación. La evaluación puede comprender técnicas *in vivo* o *ex vivo*, como la formación de imágenes y/o la histología. Las técnicas de formación de imágenes incluyen, pero no se limitan a, radiología o medicina nuclear, por ejemplo, CT que incluye SPECT-CT y/o FMT-CT; IRM que incluye IRM de difusión ponderada

(DWI) o IRMf; PET; formación de imágenes ópticas, tal como formación de imágenes fluorescentes por reflectancia; ultrasonidos, microscopía, fluoroscopia, autorradiografía y/o formación de imágenes con fósforo. Técnicas de histología y/o de tinción se pueden realizar, tales como la tinción TTC, inmunohistoquímica y/o histoquímica.

En una realización, el modelo animal se puede usar con técnicas moleculares de formación de imágenes para evaluar los procesos fisiológicos, tales como inflamación, coagulación de la sangre o activación del complemento que pueden tener lugar debido a la liberación de un émbolo. Por ejemplo, una molécula implicada en un proceso fisiológico de interés se puede marcar con un agente de contraste, un radioisótopo o un colorante que sea apropiado para la modalidad de formación de imágenes. Los colorantes y contrastes que se utilizan en diversas modalidades de formación de imágenes se han descrito anteriormente y son bien conocidos por un experto en la técnica. Véase por ejemplo, Pysz MA et al. 65 Clinical Radiology 500-516, 2010.

E. Candidatos terapéuticos

En otra realización de la invención tal como se describe, el modelo animal puede ser útil para la evaluación de un candidato terapéutico para el tratamiento de SBI. La expresión "capacidad de reducir" tal como se utiliza en la frase "el candidato terapéutico se somete a ensayo para estudiar su capacidad para reducir una lesión isquémica en el cerebro", se debe entender como cualquier candidato terapéutico que se somete a ensayo cuando la finalidad del

ensayo del candidato terapéutico es evaluar si puede reducir una lesión isquémica, es decir, si el candidato terapéutico puede limitar o tratar una SBI. Por lo tanto, un candidato terapéutico del ensayo se puede administrar a un modelo animal de SBI, y se evalúa su capacidad para reducir una lesión isquémica en el cerebro. La evaluación puede revelar que el candidato terapéutico disminuye, aumenta o no produce ningún cambio en la cantidad de lesión isquémica o los estados asociados con la lesión isquémica en el cerebro.

En una realización, el candidato terapéutico se administra al animal antes, durante y/o después del procedimiento. La evaluación se puede realizar una o varias veces durante todo el ensayo. Por ejemplo, la formación de imágenes *in vivo* se puede realizar antes, durante y/o después del procedimiento o de la administración del candidato terapéutico. Los controles pueden incluir un animal que no recibe el candidato terapéutico o pueden incluir la formación de imágenes de un animal antes y después del procedimiento o de la administración del candidato terapéutico.

En una realización del modelo animal, el candidato terapéutico se puede administrar 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 o 96 horas o más antes, durante y/o después del procedimiento. El candidato terapéutico se puede administrar en una sola dosis, o en dosis múltiples, o repetidamente a intervalos de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 o 48 horas o más antes, durante y/o después del procedimiento. En una realización, el candidato terapéutico es un inhibidor de FXII. Debido a la propiedad ventajosa de no aumentar el riesgo de hemorragia, el inhibidor de FXII se puede administrar durante el procedimiento y/o antes y/o después del procedimiento. La dosis de candidato terapéutico puede depender de las propiedades del candidato terapéutico, tales como la semivida o la toxicidad, o puede depender del tipo o del tamaño del animal utilizado, o del estado del animal que se utiliza, y puede ser necesario que se determine empíricamente. Por ejemplo, en una realización, la dosis de inhibidor de FXII es 1 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, o desde 1-1000 mg/kg, o 50-500 mg/kg, o 100-200 mg/kg. La dosis del candidato terapéutico se puede administrar al animal a través de cualquier método utilizado para administrar un candidato terapéutico a un animal. En una realización, el candidato terapéutico se administra sistémicamente. En una realización, el candidato terapéutico se administra mediante inyección intravenosa en la vena de la cola.

En una realización, el candidato terapéutico es un anticuerpo. Un anticuerpo puede estar en forma de una Ig de longitud completa, Fab, F(ab)₂, Fv, scFv u otra forma o variante de los mismos. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede estar caracterizado porque el isotipo es IgM, IgD, IgA, IgG o IgE, o variantes de los mismos. El anticuerpo puede ser de una especie de mamífero, incluyendo, pero no limitadas a, ser humano, ratón, rata, conejo, cabra, hámster o mono. El anticuerpo puede estar humanizado o injertado con CDR. El anticuerpo puede estar mutado o modificado para alterar la inmunogenicidad, la semivida o para impartir otras propiedades ventajosas asociadas con un anticuerpo terapéutico. En una realización, el anticuerpo inhibe una molécula implicada en la fisiopatología de la SBI. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-FXII. En esta realización, el anticuerpo se puede unir a un epítipo en la cadena pesada o la cadena ligera de FXII (en donde "FXII" incluye FXII y FXIIa), tal como un epítipo neutralizante. El anticuerpo puede tener afinidad elevada y/o avidéz elevada para unirse a FXII. El anticuerpo puede tener la propiedad de ser capaz de reconocer más de un antígeno. El anticuerpo se puede conjugar con un polipéptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña.

En otra realización, el agente terapéutico es una proteína, un péptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña. La expresión "molécula pequeña" se refiere a un compuesto de bajo peso molecular. Una molécula pequeña puede ser, por ejemplo, menor de 1000 Dalton, lo que permite la difusión a través de las membranas celulares. Una molécula pequeña se puede caracterizar porque se une con alta afinidad a una molécula de la vía de coagulación, o FXII, o una molécula implicada en la fisiopatología de la SBI. Una molécula pequeña preferida es una que se puede reabsorber desde el tracto GI.

Las realizaciones de la invención tal como se describe, se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes. Otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica gracias a la consideración de la memoria descriptiva y la puesta en práctica de las realizaciones descritas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción de Infestina-4 y rHA-Infestina-4

La secuencia de ADN complementaria de Infestina-4 se sintetizó y se extendió con una secuencia codificadora de un enlazador (Gly-Gly-Ser)₃ en su posición 5 y se insertó en los sitios *Bam*H1 y *Not*I de pRESpuro3 (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). El ADN complementario a albúmina fue amplificado por PCR con el cebador directo 5-GCGGCTAGCATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCC-3 (SEQ ID NO: 8) y el cebador inverso 5-GCGGGATCCTCAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTG-3 (SEQ ID NO: 9). El amplicón se digirió con *Nhe*I y *Bam*H1 y se insertó en los sitios *Nhe*I/*Bam*H1 del vector de Infestina-4. El vector resultante, capaz de expresar una proteína de fusión que consistía en albúmina-enlazador Infestina-4 (rHA-Infestina-4), se cultivó en *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se purificó usando protocolos convencionales (Qiagen, Hilden, Alemania). Las células HEK-293 se transfectaron con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio exento de suero (Invitrogen 293 Express) en presencia de 4 µg/ml de puomicina. Las poblaciones de células transfectadas se cultivaron en fermentadores. Se recogió el material sobrenadante para purificar la proteína de fusión producida. rHA-Infestina-4 se purificó mediante cromatografía de afinidad inmunológica. El material sobrenadante de la fermentación se aplicó a una columna anti-albúmina equilibrada. El producto se eluyó con un tampón de glicina (pH 2,5). Véase el

documento WO 2008/098720; Hagedorn I et al. 117 Circulation 1153-1160, 2010.

Una estructura artificial de Infestina-4 marcada con (His)₆ se generó y se encontró que tenía una semivida más corta si se comparaba con la estructura artificial de rHA-Infestina-4. Véase el documento WO 2008/098720; Hagedorn I et al. 117 Circulation 1153-1160, 2010. La Infestina-4 marcada con (His)₆ se purificó mediante cromatografía con quelato de metal de cobre sobre POROS MC 20. El material sobrenadante de la fermentación se aplicó sobre una columna de cobre cargada con sulfato, equilibrada con tampón fosfato-cloruro de sodio (pH 7,7). La Infestina-4 marcada con (His)₆ eluyó posteriormente en un gradiente de imidazol.

Ejemplo 2: Modelos animales de SBI

La solicitud proporciona modelos animales realistas que reflejan mecanismos heterogéneos que conducen a SBI. En una realización del modelo animal, la lesión isquémica se puede inducir con microperlas que imitan émbolos no trombolizables, como aire o grasa que pueden ser el resultado, p. ej., de procedimientos vasculares y cirugías. En otra realización del modelo animal, la lesión isquémica se puede inducir con sangre coagulada que puede ser el resultado de alteraciones en la cascada de la coagulación o una lesión de la pared vascular.

Todos los experimentos se realizaron en ratones Balb/c adultos (25-30 g; n = 24), obtenidos de Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA). La Junta de Revisión Institucional aprobó todos los experimentos con animales. Los animales estaban controlados fisiológicamente durante y después de todos los procedimientos. Los ratones se anestesiaron en una cámara de isoflurano con 2% de isoflurano mediante inhalación con 2 L/min de oxígeno suplementario y se transfirieron a una almohadilla térmica caliente, en posición de decúbito supino, manteniendo el isoflurano. Utilizando los procedimientos descritos a continuación, microperlas o sangre coagulada producida *ex vivo* se inyectaron en un solo lado de forma retrógrada, a través de la arteria carótida externa en la arteria carótida interna, mientras que la arteria carótida común se ocluyó temporalmente para forzar al émbolo en el sistema arterial del cerebro sin poner en peligro la perfusión.

A. Procedimiento

Después de que el animal fuera anestesiado, se afeitó el cuello y se aplicó Nair para la eliminación completa del pelo. A continuación, el cuello se limpió con alcohol isopropílico y se cubrió con una gasa estéril. Se realizó una incisión vertical en el cuello, y la glándula parótida expuesta se retiró a un lado. Se identificaron las arterias carótidas comunes, internas y externas y se aislaron. Se emplearon suturas de nailon 10-0 de Ethicon (Johnson & Johnson, Bruselas, Bélgica) para todas las ligaduras arteriales. Se ligaron dos suturas 10-0 alrededor de la arteria carótida externa, una alrededor de la arteria carótida interna y otra alrededor de la arteria carótida común. Las dos suturas alrededor de la arteria carótida externa se ligaron después, y luego se cortó la arteria entre las mismas. En este punto, los ratones en un grupo de control, en los que solo se había realizado la ligadura de la arteria carótida externa, no fueron sometidos a ninguna intervención adicional con el fin de asegurar que esta parte del procedimiento no daba lugar a ninguna lesión cerebral. A continuación, las ligaduras temporales se ligaron alrededor de las arterias carótidas común e interna. Un catéter de polietileno PE10 modificado de Intramedic (I.D. 0,28 mm, I.D. 0,61 mm, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) se insertó en el extremo proximal abierto de la arteria carótida externa y se realizó una sutura en el lugar. El catéter era un catéter estándar de PE10 que se había modificado mediante una aplicación suave de tracción y estiramiento manual del tubo para lograr un lumen y un diámetro ligeramente más estrechos. A continuación, la ligadura de la arteria carótida interna se liberó permitiendo el flujo solo hacia la arteria carótida interna, en el sistema arterial que irriga el cerebro. Se observó un retorno de sangre arterial en el catéter, y entonces se inyectaron o bien microperlas o sangre coagulada preparada (Figura 4).

Para las microperlas fluorescentes, se determinó que una inyección intracarotídea de aproximadamente 500 microperlas, daba como resultado microlesiones reproducibles, clínicamente silentes. Una jeringa cargada con aproximadamente 45 microperlas de 500 Fluoresbrite[®] Plain YG (Polysciences, Inc., Warrington, PA, 42,58 ± 0,8 µm de diámetro, excitación máx. = 441 nm, emisión máx. = 486 nm) se fijaron al catéter y se inyectaron (Figura 4A + D).

Para la sangre coagulada fluorescente, se retiraron 500 µL de sangre fresca heteróloga de ratón, a partir de ratones donantes mediante punción cardíaca y se agregaron inmediatamente a una solución de citrato de sodio para la anti-coagulación inicial (concentración final, 0,32%). Se añadió CaCl₂ 20 µmol al plasma, seguido de 10 unidades de trombina humana de alta actividad, para inducir la coagulación (Calbiochem[®], EMD Chemicals, Inc., Darmstadt, Alemania, PM 37.000, 100 unidades/mL, actividad específica 2800 unidades de NIH/mg de proteína). Después de dejar que la sangre se coagulara a temperatura ambiente durante una hora, se añadió 2 nmol de Genhance 680TM, un agente de acumulación de sangre cercano al infrarrojo (VisEn Medical, Bedford, MA) para incubar a 4°C durante 72 horas. Esto permitió una tinción fluorescente de la sangre coagulada para la detección *ex vivo* posterior, a través de formación de imágenes con fluorescencia. Este período de tiempo permitía la contracción y la estabilización de la sangre coagulada. Cuando estuvo lista para el uso, la sangre coagulada se retiró y se lavó con solución salina normal. Se añadieron 250 µL de solución salina normal a la sangre coagulada y después se utilizó un homogeneizador de tejidos para reducir la sangre coagulada en pequeñas partículas (Figura 4B). A continuación, se introdujeron 10 µL de esta solución de microémbolos fluorescentes en una jeringa y se inyectaron.

Después de la inyección de las microperlas o la sangre coagulada, se retiró el catéter y la sutura que había estado

sujetando el catéter en su lugar, se retiró para cerrar la arteria carótida externa. Las ligaduras en la arteria carótida interna y carótida común se volvieron a abrir para restaurar el flujo sanguíneo al cerebro, y se volvió a colocar la glándula parótida y la piel se cosió con una sutura de nailon 7-0. El animal fue devuelto a su jaula y se permitió su recuperación.

- 5 Después de la recuperación de la anestesia, los ratones fueron evaluados para estudiar los déficits de comportamiento y motores manifiestos. En cada animal se observó discinesia, letargo, agarre, debilidad en las extremidades, caída del párpado, trastorno de la marcha, caminar en círculos y revolcarse. La observación de cualquiera de los síntomas mencionados anteriormente se consideró que era un indicador de accidente cerebrovascular, mientras que la falta de los síntomas anteriores indicaba que no se había producido un accidente cerebrovascular manifiesto, lo que era compatible con la posibilidad de SBI. Si no había síntomas de accidente cerebrovascular, los ratones se utilizaron para una evaluación adicional de la SBI. De lo contrario, los ratones fueron excluidos de la evaluación adicional de la SBI y se sacrificaron.

B. Grupos de tratamiento

- 15 Después de la optimización de los modelos de SBI, se estudiaron 4 cohortes (n = 5-7 por grupo): ratones con inducción de SBI mediante sangre coagulada o microperlas (controles no tratados), y 2 grupos adicionales en los que los ratones fueron tratados con rHA-Infestina-4 a una dosis de 200 mg/kg mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. Los ratones recibieron su primera inyección inmediatamente después de la inducción de SBI. La formación de imágenes mediante tomografía computarizada de emisión monofotónica-tomografía computarizada (SPECT-CT) de la actividad del FXIII se realizó 3 horas después de la SBI. Las cohortes a partir de las cuales se obtuvieron imágenes tres días después de SBI por IRM, recibieron inyecciones diarias hasta e incluido el día 3 después de la lesión. La tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) se evaluó 3 días después de la SBI.

C. IRM

- 25 La inflamación se evaluó mediante IRM (mieloperoxidasa (MPO)-Gd, día 3). La IRM se realizó utilizando un escáner Bruker 4.7T con una exploración RARE T1 (TR:1500 ms, TE:8,48 ms, Promedio: 8, Matriz: 192 x 192 x 22, Tamaño de vóxel: 0,133 mm x 0,13 mm x 0,5 mm), una RARE T2 con la misma geometría (TR:5622,893, TE: 20 ms, Promedio: 4) y una imagen de difusión ponderada (DWI), utilizando una secuencia de difusión ponderada EPI con 6 direcciones de difusión (TR:4800 ms, TE: 32 ms, Matriz: 128 x 128 x 22, Tamaño de vóxel: 0,195 mm x 0,195 mm x 0,5 mm).

- 30 Los ratones fueron escaneados antes y cada 15 min, hasta 90 min después de la administración intravenosa de 0,3 mmol/kg de agente de contraste gadolinio-mieloperoxidasa, diluido en 10% de DMSO. Los ratones se sacrificaron después, se perfundieron y los cerebros se recogieron y se realizaron cortes para la formación de imágenes fluorescentes en el microscopio OV-100 (Olympus) para verificar que se había producido SBI.

- 35 Para el análisis de datos, se empleó el programa informático Amira (Visage Imaging, San Diego, CA). Las regiones de interés (ROIs) se identificaron en cada corte de imagen de las exploraciones T1, 90 minutos después de la inyección. Los ventrículos cerebrales fueron excluidos individualmente antes de la segmentación automática de áreas positivas para MPO y esta segmentación fue verificada por un radiólogo acreditado. Los vóxeles positivos para MPO fueron identificados automáticamente por la intensidad de la señal de 1,25 veces la señal de fondo normal promedio del cerebro. Los valores de amplitud de la señal se dividieron por la desviación estándar del ruido de una ROI fuera del cuerpo del ratón, para calcular la relación entre contraste y ruido (CNR) de los vóxeles positivos para MPO. Las imágenes T2 fueron segmentadas de una manera similar para la visualización 3D.

D. SPECT-CT

- 45 La coagulación se evaluó mediante SPECT-CT (FXIII-Ind, 3 horas). Los grupos de ratones se sometieron a inducción de SBI y tratamiento una hora antes de la inyección, de aproximadamente 1 mCi de un péptido FXIII-sustrato marcado con indio-111 (la cantidad real inyectada era de 731-1273 μ Ci). Dos horas después de la inyección, se realizó la SPECT-CT utilizando el sistema de formación de imágenes para animales pequeños Gamma Medical-ideas X-SPECT. La exploración de CT se realizó empleando un tubo de rayos x con haz cónico (50 kVp, 500 mA) con un detector CMOS en estado sólido durante 256 proyecciones. Estas proyecciones se reconstruyeron utilizando el algoritmo de reconstrucción Feldkamp modificado. La exploración SPECT utilizaba dos cámaras gamma con colimadores de agujero estenopecoico de energía media de 1 mm, a través de 64 proyecciones (32 proyecciones de cada cámara) a 90 s/proyección. Las imágenes de SPECT se reconstruyeron utilizando el algoritmo de maximización de la esperanza de subconjuntos ordenados (OSEM) y se fusionaron con las imágenes de la CT para una colocación anatómica precisa de la información molecular.

- 55 Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la formación de imágenes SPECT-CT, tomando una muestra de sangre. El animal fue perfundido con 20 ml de solución salina. Se tomó una muestra de músculo; el cerebro se extirpó y, junto con la muestra de sangre, se realizó un recuento en un contador de pocillos gamma Wallac Wizard 1480. A continuación, el cerebro se cortó en secciones de 2 mm y se tomaron imágenes sobre el escáner fluorescente Olympus Biosystems OV-100. Se obtuvieron imágenes de los cortes del cerebro en ambos lados. Después los cortes se colocaron en placas de un dispositivo Phosphorimager durante una noche, para la autorradio-

grafía. Las placas se leyeron en un lector de placas de un dispositivo Phosphorimager Typhoon de Molecular Dynamics.

5 Para el análisis de los datos de SPECT-CT, el cerebro y el músculo fueron segmentados manualmente a partir de las imágenes de CT, utilizando el programa informático Amira para calcular la relación entre diana y ruido de fondo (TBR) entre el cerebro y el músculo. Los datos se normalizaron para la masa del cerebro y la dosis inyectada de cada animal. En la autorradiografía, en el recuento gamma y en los datos de SPECT se corrigió la atenuación. Visualizaciones en 3D de los datos de SPECT-CT fueron reconstruidas utilizando el programa informático Osirix (Pixmeo, Ginebra, Suiza).

E. Evaluación ex vivo

10 Después de los estudios de formación de imágenes IRM y SPECT-CT, los animales fueron sacrificados y los cerebros se extirparon.

15 Si el ratón formaba parte del subgrupo SPECT-CT, el cerebro se midió primero en busca de actividad radiactiva general mediante recuento de centelleo. El cerebro fresco se cortó entonces en secciones coronales de 2 mm de espesor utilizando un aparato para cortar secciones de cerebro de ratón (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA). A continuación, se formaron imágenes inmediatamente con todos los cerebros con un sistema de formación de imágenes OV-100™ para animales pequeños (Olympus, Center Valley, PA), un híbrido de un sistema de formación de imágenes con fluorescencia por reflectancia planar y un microscopio de alta potencia. Se formaron imágenes de las secciones de cerebro utilizando un canal de fluorescencia de campo brillante y GFP (excitación a 400 nm, emisión a 508 nm) para las microperlas y el canal cercano al infrarrojo para la sangre coagulada fluorescente (emisión a 680 nm), con un máximo de 16 aumentos. Dependiendo de la resolución seleccionada, la longitud de onda y los aumentos, los tiempos de adquisición de imágenes oscilaron entre 5 ms y 60 segundos por fotograma para las imágenes. Las imágenes de luz blanca también se adquirieron con una cámara digital para evaluar una hemorragia potencial causada por la lesión. Para los ratones en el estudio SPECT-CT, los cortes de cerebro se colocaron después una noche en un generador de imágenes con fósforo.

25 Si el ratón formaba parte del subgrupo IRM, los cortes de cerebro se colocaron en TTC al 1% en solución de PBS durante 30 minutos a 37°C. A continuación, las secciones del cerebro se lavaron tres veces con PBS un minuto cada vez. Después se fotografió el cerebro con una cámara digital (Olympus FE-280) para evaluar la tinción con TTC. El tejido cerebral viable se teñía de rojo con TTC, mientras que las regiones infartadas no se teñían. Para los ratones utilizados para la inmunohistoquímica (IHC), un corte central del cerebro se tiñó con TTC, mientras que los cortes adyacentes se fijaron para IHC.

30 Para un análisis histológico adicional, los cortes adyacentes de tejido cerebral se fijaron en compuesto O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance, CA), y se cortaron secciones congeladas en serie de 5 µm. El método de avidina-biotina peroxidasa se utilizó para IHC y las secciones de tejido se incubaron con anticuerpo de FXIII: C-20 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) seguido de anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de cabra (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). La reacción se visualizó con un sustrato de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (DakoCytomation, Carpinteria, CA) y todas las secciones se contratiñeron con una solución de hematoxilina de Harris. Los cortes se digitalizaron de forma automática con un aumento de 400 y las imágenes fueron capturadas utilizando NanoZoomer HT1.0 (Hamamatsu, Japón).

40 Los resultados se expresan como media + SEM. Las comparaciones estadísticas entre los dos grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student y se corrigieron con ANOVA para comparaciones múltiples. Un valor de p <0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Los mismos análisis estadísticos se utilizaron en todos los ejemplos, cuando se observaron los valores de p.

Ambos modelos producían oclusiones vasculares cerebrales en vasos pequeños (Figura 4D + E) que pueden dar lugar a isquemia cerebral clínicamente silente (Figura 5).

45 Ambos modelos producían pequeños infartos (Figura 5) que ocupaban <5% del cerebro total, tal como se evaluó mediante tinción con TTC. El método de microperlas producía una lesión tisular ligeramente mayor en comparación con el modelo de sangre coagulada. Se observaron lesiones principalmente en el lado de la inyección.

Ejemplo 3: Tratamiento de SBI con rHA-Infestina-4

50 Después del tratamiento con rHA-Infestina-4, los ratones en ambos modelos de SBI experimentaron significativamente menos microinfartos, con una reducción >50% en los infartos detectados mediante tinción con TTC. Había una reducción ligeramente mayor en el área del infarto en el modelo de sangre coagulada (reducción del 66%, Figura 5B) en comparación con la del modelo de microperlas (reducción del 54%, Figura 5A). El modelo de microperlas imita émbolos de sustancias que no afectan directamente a la vía de coagulación; sin embargo rHA-Infestina-4 también reducía las áreas infartadas en este modelo.

55 Se encontró una evidencia relativamente frecuente de microhemorragias en ambos modelos de SBI, con 6/8 (75%) de los ratones en el modelo de microperlas y 5/9 (56%) de los ratones en el modelo de tromboémbolos (Figura 6).

Sin embargo, después de la administración de rHA-Infestina-4 no se encontró un aumento de la frecuencia de microhemorragias en ningún modelo. De hecho, posiblemente había una disminución de la tasa de microhemorragias en el modelo de sangre coagulada (solo 1/8 animales tenían microhemorragias, Figura 6, abajo a la derecha).

Curiosamente, de forma similar a los estudios anteriores de accidente cerebrovascular (Kleinschnitz C et al., J Exp Med., 203:513-518, 2006; Hagedorn I et al. Circulation, 121:1510-1517, 2010), tampoco se encontró un aumento de la frecuencia de hemorragia en SBI, con una menor tasa de hemorragia en el modelo de sangre coagulada, después del tratamiento con rHA-Infestina-4. A pesar de que hay que corroborar y estudiar más a fondo esta tasa más baja, esto implica que rHA-Infestina-4 puede reducir la lesión vascular causada por sangre coagulada. Además, tiene relevancia clínica porque apunta a un perfil favorable de efectos secundarios no deseados, ya que la terapia anti-coagulante general conlleva generalmente un aumento del riesgo de hemorragia. Este no era el caso en nuestro estudio actual.

Ejemplo 4: rHA-Infestina-4 disminuye la actividad del FXIII en SBI

Para evaluar el efecto de la rHA-Infestina-4 sobre la cascada de la coagulación, se evaluó la actividad de FXIII, que se encuentra abajo de FXII y está afectada por FXII, y es responsable de la formación de coágulos de fibrina reticulados. La formación de imágenes *in vivo* con SPECT-CT se realizó empleando una sonda específica de FXIII, FXIII-Ind (Tung CH et al. 4 Chembiochem. 897-899, 2003; Nahrendorf M et al. 113 Circulation 1196-1202, 2006) durante el estadio agudo, después de la inducción de SBI. Había una reducción significativa de la cantidad de actividad de FXIII después de la administración de rHA-Infestina-4, tanto en el modelo de sangre coagulada (Figura 7) como en el de microperlas (Figura 8). Esto fue corroborado por experimentos de autorradiografía en especímenes cerebrales *ex vivo* (Figuras 7 y 8, paneles centrales). El grado global de reducción de la actividad de FXIII se visualizaba bien en las imágenes fusionadas en 3D (Figuras 7 y 8, paneles de la izquierda). Al igual que con el grado de reducción del infarto, había una reducción más pronunciada de la actividad de FXIII en el modelo de sangre coagulada, en comparación con el modelo de microperlas. Los resultados *in vivo* de la formación de imágenes se confirmaron mediante tinción inmunohistoquímica para FXIII (Figura 9).

Es interesante observar que el modelo de microperlas producía una actividad elevada del Factor XIII/coagulación, la cual disminuía con la administración de rHA-Infestina-4. Esto sugiere que la embolización con microperlas causaba una formación de coágulos de fibrina, y una coagulación secundaria inducida, debido a una lesión del tejido que podía haber causado un daño adicional y oclusión de los vasos afectados. De hecho, encontramos en la histopatología que había un mayor contenido de FXIII en las áreas del cerebro dañadas de ratones control sin tratar (Figura 9). Curiosamente, el modelo de microperlas daba lugar a más lesiones y áreas hemorrágicas, en comparación con el modelo de sangre coagulada. Se podría especular que el modelo de microperlas es más o menos un modelo permanente, lo que agrava los efectos patológicos, mientras que la sangre coagulada inyectada puede estar sujeta a una trombólisis (parcial) que conduce a resultados menos graves. Sin embargo, esta formación de coágulos secundarios observada en ambos modelos se puede reducir de manera significativa con rHA-Infestina-4, para limitar el daño procedente de las sustancias embolizadas empleadas.

Ejemplo 5: rHA-Infestina-4 no altera la actividad de la mieloperoxidasa en el cerebro después de SBI

La mieloperoxidasa (MPO) es la enzima secretada de forma más abundante en muchas células mieloides pro-inflamatorias, tales como neutrófilos, monocitos Ly6c^{hi} y subconjuntos de macrófagos activados y microglía durante la inflamación y, por lo tanto, es un biomarcador adecuado de la respuesta inflamatoria en la formación de imágenes. Para evaluar la actividad de la MPO, IRM *in vivo* se realizó tres días después de SBI, utilizando la sonda MPO-Gd (Chen JW et al. 240 Radiology 473-481, 2006; Querol M et al. 4 Org Biomol Chem. 1887-1895, 2006), que es altamente específica y sensible para la actividad de MPO (Rodríguez E et al. 132 J. Am. Chem. Soc. 168-177, 2010; Ronald JA et al. 120 Circulation 592-599, 2009; Chen JW et al. 131 Brain 1123-1133, 2008; Breckwoldt MO et al. 105 PNAS 18584-18589, 2008; Nahrendorf M et al. 117 Circulation 1153-1160, 2008).

Había más actividad de MPO difusa que afectaba a un volumen mayor, en comparación con las áreas infartadas según lo informado por la formación de imágenes ponderadas T2 en ambos modelos (Figuras 10 y 11, panel izquierdo, obsérvese que hay más lesiones naranjas (MPO+ áreas) en comparación con las azules (focos hiperintensos T2), y el panel de arriba a la derecha, que muestra MPO+ áreas normalizadas para T2 que son mayores que la unidad). El modelo de microperlas inducía una mayor actividad de MPO, en comparación con el modelo de sangre coagulada (CNR, perlas: 36 ± 1 , coágulos: 23 ± 2 , $p < 0,05$) y lesiones de mayor tamaño (número de T2 + vóxeles en el cerebro, perlas: 3162 ± 1435 , coágulos: 548 ± 207 ; $p = 0,05$).

Después de la administración de rHA-Infestina-4, no había un cambio significativo en las áreas normalizadas de MPO+ lesiones y la CNR promedio de todas las MPO+ lesiones en ambos modelos de SBI, lo que demuestra que la rHA-Infestina-4 no afecta a la actividad de MPO y, por lo tanto, a la actividad de células mieloides. Por ello, a pesar de un posible efecto antiinflamatorio deducido de la función de FXII, la rHA-Infestina-4 no cambiaba la cantidad de actividad de MPO por lesión el día 3 después de la inducción de SBI. El día 3 fue elegido para evaluar la actividad de MPO y la inflamación, porque se encontró que este punto de tiempo era el punto de tiempo con la máxima actividad de MPO en un modelo de accidente cerebrovascular (Breckwoldt MO et al. 105 PNAS 18584-18589, 2008). Por lo tanto, otras partes de la cascada inflamatoria pueden verse afectadas por rHA-Infestina-4 lo que no se refleja en la

actividad de MPO el día 3 (Breckwoldt MO et al. 105 PNAS 18584-18589, 2008). La mayoría de las células inflamatorias implicadas en la isquemia cerebral son células mieloides, por lo tanto, incluso si otros factores están afectados por rHA-Infestina-4, el efecto puede ser pequeño.

- 5 El inhibidor de FXII rHA-Infestina-4 se puede emplear para tratar una lesión isquémica asociada con varios tipos de émbolos que conducen a SBI, sin aumentar el riesgo de hemorragia en un paciente o en un animal. Además, dichos modelos animales y los enfoques de formación de imágenes pueden ser útiles como herramientas para estudiar los mecanismos subyacentes a la fisiopatología de la SBI, evaluar y realizar un seguimiento de candidatos terapéuticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> The General Hospital Corporation CSL Behring GmbH
- 10 <120> Inhibidores del Factor XII para el tratamiento de isquemia cerebral silente e isquemia de otros órganos

<130> 2011_M001_A178

<150> EP 11157555.1

< 151> 2011-03-09
- 15 <150> US 61/457,360

< 151> 2011-03-09

<150> US 61/496,746

< 151> 2011-06-14

<160> 9
- 20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 48

< 212> PRT

< 213> Trioma infestans
- 25 <400> 1

Glu	Val	Arg	Asn	Pro	Cys	Ala	Cys	Phe	Arg	Asn	Tyr	Val	Pro	Val	Cys
1				5					10					15	

Gly	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Pro	Cys	Met	Leu	Asn	Cys	Ala
			20					25					30		

Ala	Gln	Thr	Lys	Val	Pro	Gly	Leu	Lys	Leu	Val	His	Glu	Gly	Arg	Cys
		35					40					45			
- 30 <210> 2

< 211> 56

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 607 063 T3

<400> 2

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn Gly Cys
1 5 10 15

Thr Lys Ile Tyr Asp Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro
20 25 30

Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile
35 40 45

Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys
50 55

<210> 3

< 211> 53

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> SPINK-1 humana mutada

<400> 3

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Pro Asn Glu Cys
20 25 30

Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Ser Gly Pro Cys
50

10

<210> 4

< 211> 53

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

15

<220>

< 223> SPINK-1 humana mutada

<400> 4

Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
20 25 30

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys
50

20

<210> 5

< 211> 54

ES 2 607 063 T3

< 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> SPINK-1 humana mutada

5

<400> 5
 Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
 1 5 10 15
 Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
 20 25 30
 Met Leu Asn Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile
 35 40 45
 Gln Lys Glu Gly Pro Cys
 50

<210> 6
 < 211> 585
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

10

<400> 6
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

ES 2 607 063 T3

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

ES 2 607 063 T3

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210> 7
 < 211> 294
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>
 < 223> Proteína de fusión

<400> 7
 Asp Ser Leu Gly Arg Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn
 1 5 10 15

Tyr Val Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Gly Asn Glu Cys
 20 25 30

10

ES 2 607 063 T3

Met Leu Cys Ala Glu Asn Arg Lys Arg Gln Thr Ser Ile Leu Ile Gln
 35 40 45

Lys Glu Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Pro
 50 55 60

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 65 70 75 80

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 85 90 95

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 100 105 110

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 115 120 125

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 130 135 140

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 145 150 155 160

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 165 170 175

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 180 185 190

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 195 200 205

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 210 215 220

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 225 230 235 240

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 260 265 270

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 275 280 285

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290

<210> 8
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 607 063 T3

<220>
< 223> Cebador

<400> 8
gcggttagca tgaagtgggt aacctttatt tccc 34

5 <210> 9
< 211> 35
< 212> ADN
< 213> Artificial

10 <220>
< 223> Cebador

<400> 9
gcgggatcct cctaagccta aggcagcttg acttg 35

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de Factor XII (FXII) para uso en la prevención y/o el tratamiento de isquemia en un paciente que recibe un procedimiento médico, en donde el procedimiento médico comprende el contacto con al menos uno entre:

(a) corazón,

5 (b) al menos un vaso sanguíneo seleccionado entre: la aorta, el arco aórtico, una arteria carótida, una arteria coronaria, arteria braquiocéfálica, circulación vertebrobasilar, arterias intracraneales, arteria renal, una arteria hepática, una arteria mesentérica y/o un vaso sanguíneo del sistema arterial craneal hacia el corazón,

(c) un vaso sanguíneo venoso si el paciente tiene un defecto septal conocido;

10 y en donde el procedimiento médico comprende la liberación de al menos un microémbolo en al menos uno de dichos vasos sanguíneos en el cuerpo lo que podría dar lugar a dicha isquemia en al menos un órgano diana y en donde el inhibidor de FXII se administra antes, durante y/o después del procedimiento médico, en donde el órgano diana es el cerebro y en donde el paciente tiene, ha tenido o tiene riesgo de (i) isquemia cerebral silente o (ii) un accidente cerebrovascular causado por una sustancia no trombolizable y en donde el inhibidor de FXII comprende

15 (i) la secuencia polipeptídica de Infestina-4 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma, en donde una variante comprende

(a) los aminoácidos N-terminales 2-13 de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácidos al margen de dichos aminoácidos N-terminales que dan lugar a diferencias con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre;

y/o

20 (b) seis residuos de cisteína conservados de la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre y una homología de al menos 70% con la secuencia de Infestina-4 de tipo silvestre;

(ii) un anticuerpo anti-FXII, en donde el anticuerpo se une a FXII e inhibe su actividad y/o activación.

2. Inhibidor de FXII para uso según la reivindicación 1, en donde el émbolo está compuesto de burbujas, aceite, grasa, colesterol, sangre coagulada y/o residuos.

25 3. Inhibidor de FXII para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el procedimiento médico comprende el contacto con el interior de al menos uno o varios de dichos vasos sanguíneos.

4. Inhibidor de FXII para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el procedimiento médico comprende el pinzamiento de al menos uno o varios de dichos vasos sanguíneos.

30 5. Inhibidor de FXII para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el procedimiento médico es un procedimiento vascular que comprende uno cualquiera o varios entre un catéter, una prótesis endovascular, un balón, un injerto y/o administrar un agente de contraste.

6. Inhibidor de FXII para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el procedimiento médico es una cirugía vascular y/o es un procedimiento vascular que es diagnóstico.

35 7. Inhibidor de FXII para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el procedimiento médico es angiografía coronaria, colocación de una prótesis endovascular en la arteria carótida, intervención coronaria percutánea, endarterectomía carótida, una cirugía cardiovascular o dilatación de una arteria renal estenótica.

40 8. Inhibidor de FXII para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el inhibidor de FXII está ligado a un polipéptido que mejora la semivida, en donde el péptido que mejora la semivida es opcionalmente albúmina, afamina, alfa-fetoproteína o proteína que se une a la vitamina D, albúmina humana o una variante de la misma, una inmunoglobulina o una variante de la misma, un Fc de una IgG.

9. Inhibidor de FXII para uso según la reivindicación 8, en donde el polipéptido que mejora la semivida está ligado al inhibidor de FXII a través de un enlazador.

10. Inhibidor de FXII para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el enlazador es

(i) escindible;

45 (ii) escindible con una proteasa de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, extrínseca o común;

(iii) escindible con FXIIa.

Figura 1

```

    ###          #####          # ##          # #
Rho EGGEPC-----ACPHALHRVCGSDGETYSNPCTLNCAKFNGKPELVKVHDGPC
I4  EVRNPC-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLVHEGRC
SP  GREAKCYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQSGPC
      ++++++++          ++ + +
    
```

Figura 2

* indica idéntico; | indica aminoácido similar; aminoácidos en **negrita** son cisteínas conservadas; aminoácidos subrayados 2-13 de la secuencia de Infestina-4 están conservados.

```

          1   5           10  15  20  25  30  35  40  45
I4      EVRNPC-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLV-HEGRC
          * | *         * | * * * * | * * * * * | * * | *         * | * *
SP:    DSLGREAK--CYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQSGPC
          1   5           10  15  20  25  30  35  40  45  50  55
    
```

Figura 3

*indica idéntico; | aminoácidos similares con respecto a la secuencia de Infestina-4. Aminoácidos subrayados en I4 se utilizaron para reemplazar aminoácidos SP. Aminoácidos subrayados en K2 y K3 son mutaciones puntuales adicionales en la secuencia de K1.

```

I4      EVRNPC-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLV-HEGRC
SP:    DSLGREAK--CYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQSGPC
      * | *          * | * * * * | * * * * * | * * | *          * *
K1:    DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQSGPC
      * * * * *          * * * * * * * * * * | * * * * * | * * | *          * *
K2:    DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECML-CAENRKRQTSILIQEGPC
      * * * * *          * * * * * * * * * * | * * * * * * * * * * | *          * | * * *
K3:    DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECMLNCAENRKRQTSILIQEGPC
      * * * * *          * * * * * * * * * * | * * * * * * * * * * | *          * | * * *
    
```

Figura 4

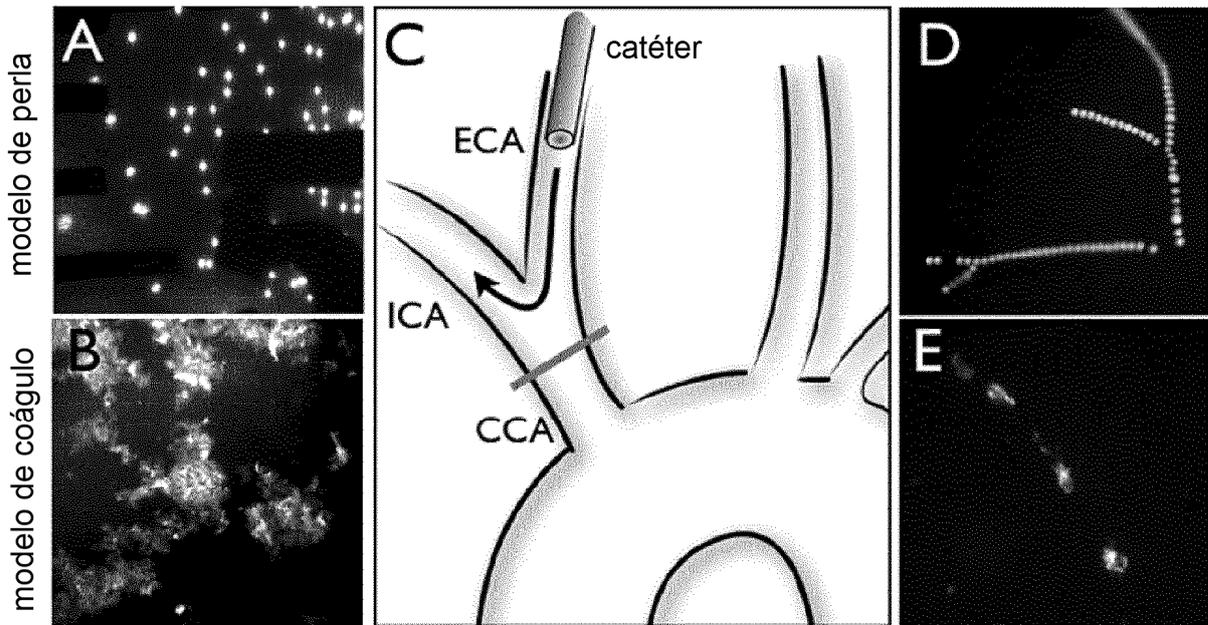


Figura 5

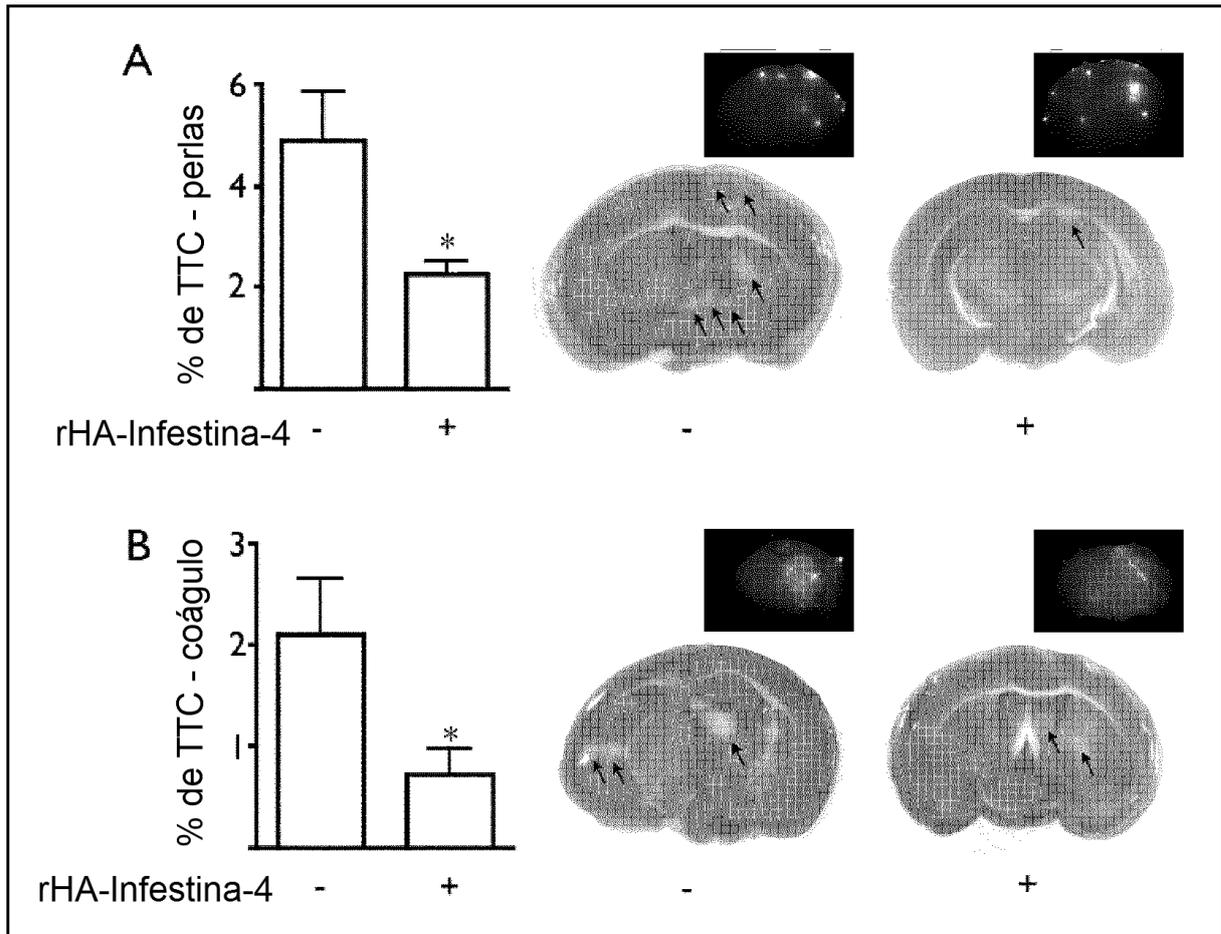


Figura 6

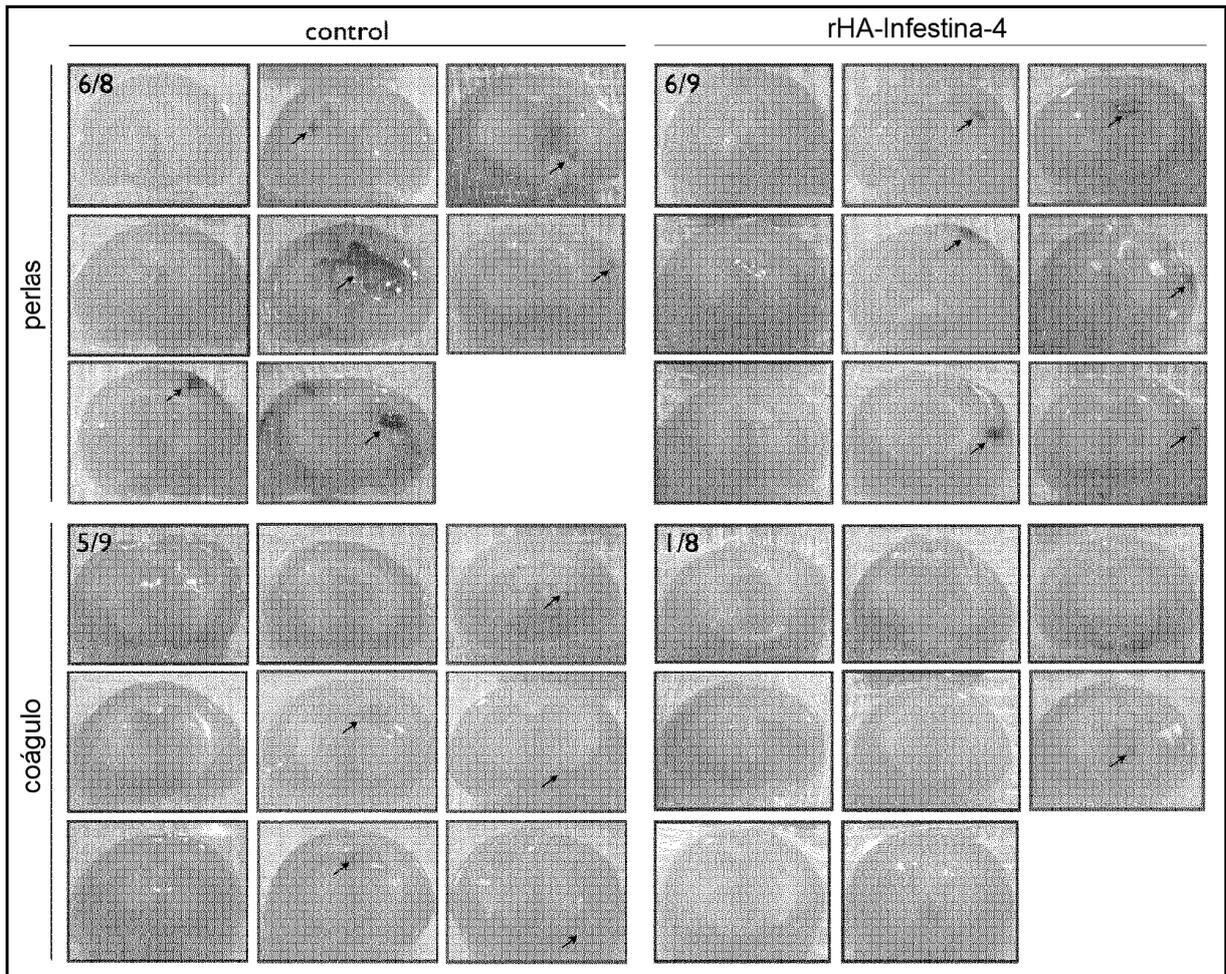


Figura 7

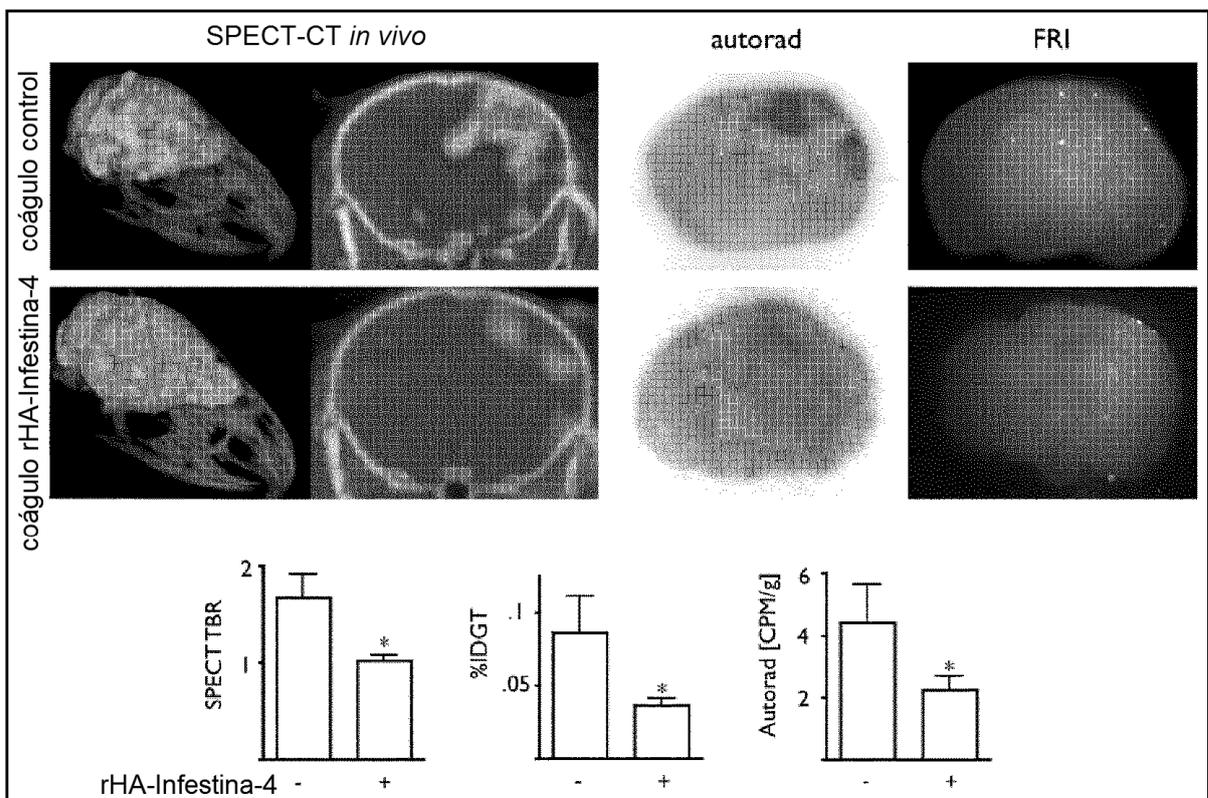


Figura 8

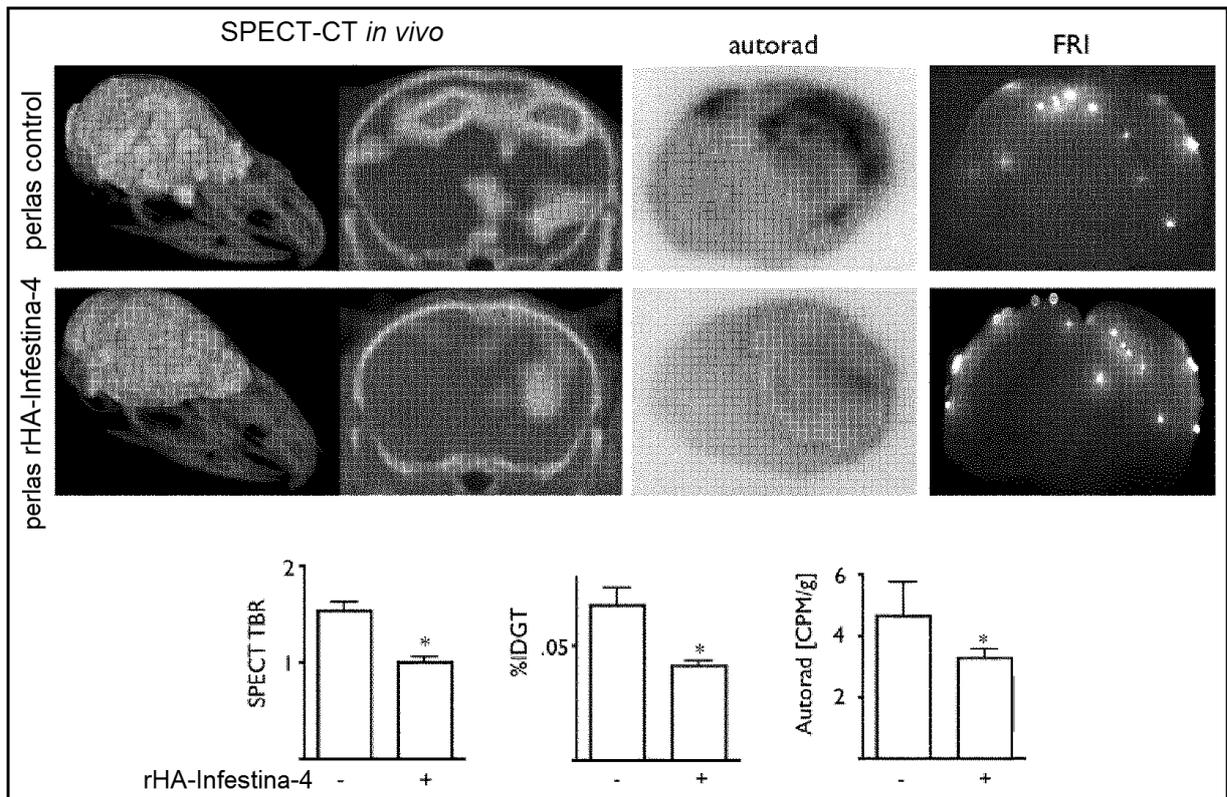


Figura 9

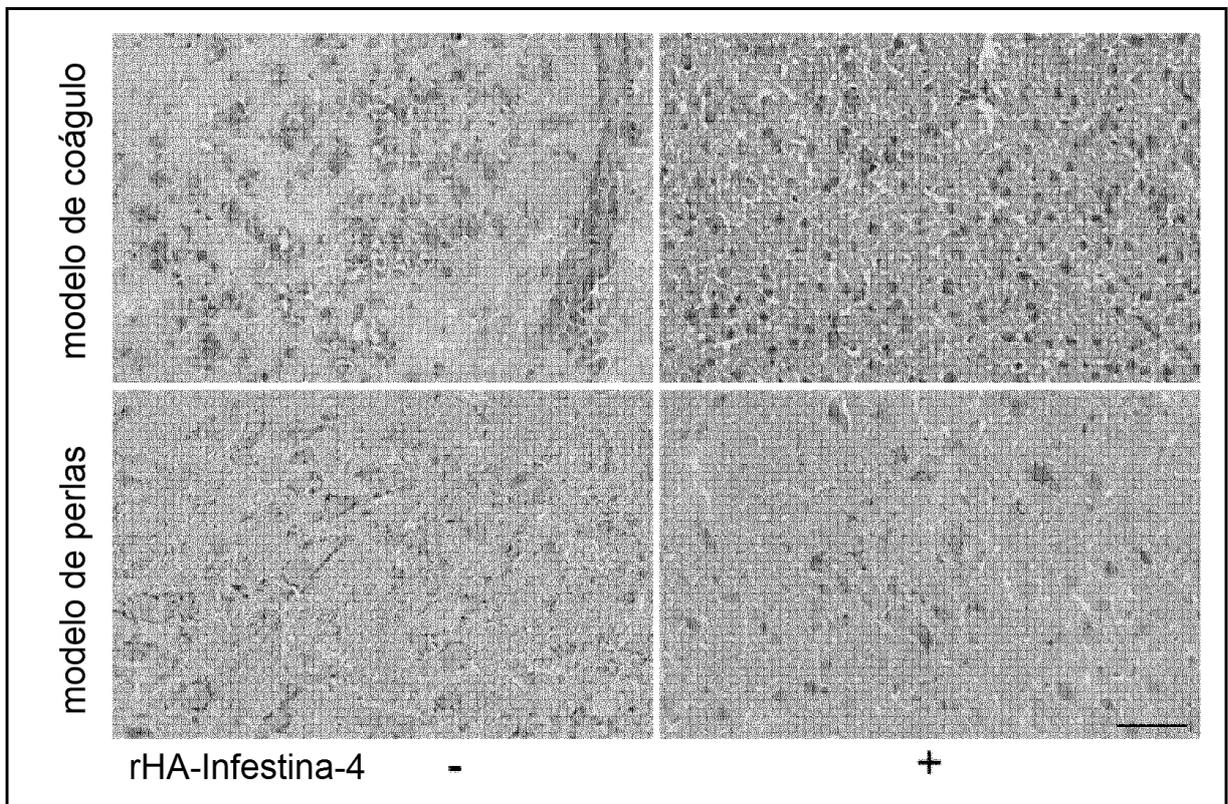


Figura 10

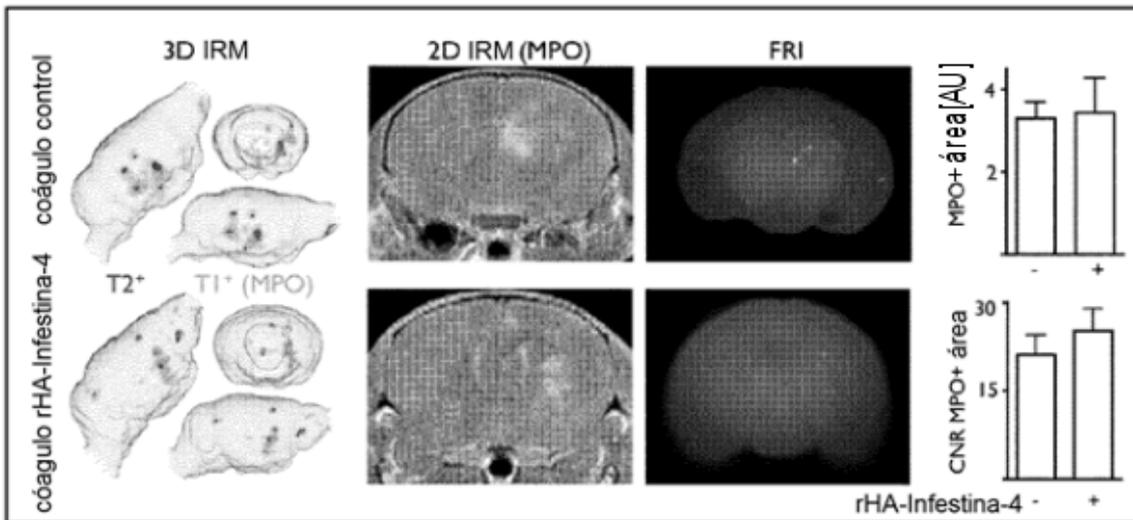


Figura 11

