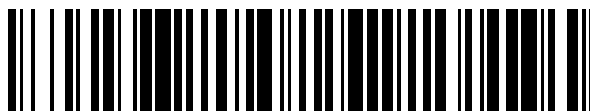


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 018**

51 Int. Cl.:

A61K 38/06	(2006.01) A61P 37/00	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01) A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/55	(2006.01)	
A61K 38/57	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	
A61K 47/50	(2007.01)	
C07K 14/81	(2006.01)	
C07K 16/36	(2006.01)	
C07K 16/40	(2006.01)	
A61P 25/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2013 PCT/EP2013/051832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113774**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2013 E 13701651 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2809336**

54 Título: **Inhibidores de factor XII para el tratamiento de trastornos inflamatorios neurológicos**

30 Prioridad:

31.01.2012 EP 12153341
31.01.2012 US 201261592652 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2018

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (25.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE;
CSL LIMITED (25.0%);
JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITAET
WUERZBURG (25.0%) y
WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER (25.0%)

72 Inventor/es:

MEUTH, SVEN;
GOEBEL, KERSTIN;
KLEINSCHNITZ, CHRISTOPH;
MCKENZIE, BRENT y
NOLTE, MARC

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 687 018 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 de factor XII para el tratamiento de trastornos inflamatorios neurológicos

La presente solicitud se refiere a enfermedades inflamatorias neurológicas, tales como esclerosis múltiple, y a métodos de administración de un inhibidor de factor XII para prevenir, tratar, o de otro modo mejorar los efectos de una enfermedad inflamatoria neurológica, tal como esclerosis múltiple. También se proporcionan agentes y composiciones farmacéuticas que comprenden agentes que inhiben la actividad de FXII.

La esclerosis múltiple (EM) es parte de un espectro de enfermedades inflamatorias neurológicas que incluyen infiltración de células inmunitarias, desmielinización y daño axonal/neuronal como parte de su patología. La Organización Mundial de la Salud (ICD-9-CM Código de Diagnóstico 340) describe la EM como una enfermedad crónica caracterizada por la presencia de numerosas áreas de desmielinización en el sistema nervioso central con síntomas tales como debilidad, falta de coordinación, parestesia y trastornos del habla. La EM y otras enfermedades similares son causadas por el ataque autoinmunitario en el que las células inflamatorias invaden el sistema nervioso conduciendo a desmielinización y destrucción de tejido (Morales et al., *Adv Neurol* 2006; 98:27-45; Frohman et al., *N Engl J Med* 2006; 354:942-55). Los corolarios histopatológicos son placas de EM con infiltrados celulares (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos), que se cree que por último lugar causan el daño oligodendroglial y axonal. A medida que progresa el proceso destructivo, la desmielinización conduce a la alteración de la función cognitiva (Ragonese et al., *Eur J Neurol* 2008;15:123-7; Bergamaschi et al., *Neuroepidemiology* 2005; 25:15-18).

La desmielinización es la pérdida de la vaina de mielina que forma una capa aislante alrededor de los axones neuronales. La mielina se produce por diferentes tipos de células dependiendo de la localización anatómica: los oligodendrocitos mielinan los axones del sistema nervioso central (SNC), mientras que las células de Schwann mielinan los axones periféricos. La mielina está compuesta por varias proteínas y lípidos, que incluyen proteína básica de mielina (MBP), glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína de proteolípidos (PLP), galactocerebrósido (GalC) y esfingomielina.

Los signos y síntomas de las enfermedades desmielinizantes varían dependiendo de la localización de la desmielinización. Algunos signos y síntomas comunes incluyen problemas visuales (visión doble, nistagmo o pérdida de visión), hormigueo o entumecimiento (parestesia), alteración del habla, pérdida de memoria, sensibilidad al calor, espasmos musculares, debilidad muscular y pérdida de coordinación o equilibrio.

El nombre "esclerosis múltiple" se refiere a las múltiples cicatrices ("esclerosis"), o lesiones, que se forman en el cerebro y la médula espinal en áreas donde se pierde la mielina. El patrón de enfermedad de la EM puede variar. Según la Sociedad Estadounidense Nacional de la Esclerosis Múltiple, existen cuatro subtipos normalizados: (1) remitente recidivante, (2) progresiva secundaria, (3) progresiva primaria y (4) progresiva recidivante. La remitente recidivante es el transcurso inicial más común de la enfermedad y se caracteriza por ataques separados por periodos de remisión que pueden durar durante meses a años, durante los cuales no existen nuevos signos de enfermedad. La enfermedad progresiva secundaria, como el nombre implica, empieza como EM recidivante-remitente, pero los periodos de remisión definidos desaparecen con el tiempo. El subtipo progresivo primario describe la enfermedad en la que nunca hay una remisión significativa después de la aparición inicial. En la enfermedad progresiva recidivante, existe una disminución neurológica estacionaria desde la aparición, pero además, existen ataques superpuestos.

La esclerosis múltiple se puede diagnosticar usando las revisiones de 2010 a los criterios de McDonald, que se basan en resonancia magnética nuclear (RMN) acoplada a la presentación clínica (Polman et al., *Ann Neurol* 2011; 69:292-302). Generalmente, un paciente que presenta dos o más ataques o dos o más lesiones clínicas objetivas se considera que tiene EM sin necesidad de evidencia clínica adicional. En pacientes con menos ataques o menos lesiones demostrables, el diagnóstico se basa en la demostración objetiva de la diseminación de lesiones en el espacio y/o tiempo por manifestaciones clínicas o clínicas y de diagnóstico (RMN).

La etiología de EM es desconocida, pero generalmente se acepta que es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario del cuerpo destruye la mielina en el SNC (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, *Nature* 2011; 476:214-9). Un requisito previo para la infiltración de células inmunitarias en el SNC es una alteración en la barrera hematoencefálica que normalmente protege el SNC de la infiltración. Este proceso da como resultado la inflamación del SNC, que es un segundo distintivo patológico de la EM. Al igual que con muchas enfermedades autoinmunitarias, la EM es más común en mujeres que en hombres, que afecta aproximadamente a 3 personas por cada 100.000 (Alonso, 2008). Además de la EM, existen otras enfermedades inflamatorias desmielinizantes. Por ejemplo, otras enfermedades inflamatorias desmielinizantes del sistema nervioso central incluyen las enfermedades inflamatorias desmielinizantes idiopáticas, mielitis transversa y neuromielitis óptica (enfermedad de Devic). La desmielinización inflamatoria también puede ocurrir en el sistema nervioso periférico: ejemplos incluyen síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Miller Fisher y neuropatía periférica anti-MAG.

Los actuales tratamientos para la EM se basan en la naturaleza autoinmunitaria de la enfermedad y se desarrollaron, al menos en parte, basándose en experimentos usando modelos animales de encefalomiелitis autoinmune

experimental (EAE) (Stüve et al., Arch Neurol. 2010; 67:1307-15). Fingolimod, autorizado por la FDA en 2010 para el tratamiento en formas recidivantes de EM, es un fosfolípido que actúa secuestrando linfocitos, las células inmunitarias que se cree que median en la destrucción de mielina (GILENYA (fingolimod), ficha técnica, revisión de 07/2011). Fingolimod también recibió la designación de fármaco sin interés comercial (EU/3/09/718) en Europa en 2010 para el tratamiento de polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica. Los tratamientos más antiguos para EM incluyen interferón beta-1a e interferón beta-1b, y acetato de glatiramer, que son inmunomoduladores (Herrmann et al., Am. J. Pathol. 2010; 177:3051-60; Stüve et al., Arch Neurol. 2010; 67:1307-15). Natalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra integrina $\alpha 4$, fue autorizado en 2004 para el tratamiento de pacientes con formas recidivantes de EM (ficha técnica de TYSABRI (natalizumab), revisión de 08/2011). Se usa generalmente como terapia de segunda línea debido a que su uso está asociado a un riesgo elevado de infección viral potencialmente mortal (LMP, leucoencefalopatía multifocal progresiva). Natalizumab bloquea la unión de leucocitos a ciertas moléculas de adhesión celulares implicadas en el paso de células de la sangre a los tejidos. Así, se cree que natalizumab funciona previniendo el paso de las células inmunitarias al SNC, previniendo así la destrucción adicional de mielina. Mitoxantrona es un agente que bloquea la síntesis de ADN y así puede reducir la capacidad de linfocitos para proliferar.

Aunque cada una de las terapias actualmente autorizadas muestra cierta eficacia en la disminución de al menos el número de ataques en las formas recidivantes de EM, su eficacia está limitada y en muchos casos está asociada a efectos secundarios significativos, haciendo poco práctica la terapia a largo plazo. Así, existe una gran necesidad biomédica sin cumplir de terapias adicionales.

El factor XII (FXII) es una serina proteasa que participa en la activación de la cascada intrínseca de la coagulación. Se identificó en 1955 como un factor de coagulación que se activa por contacto con polianiones (activación por contacto). *In vivo*, estas superficies incluyen polifosfatos inorgánicos (PoliP) que son secretados por plaquetas activadas (Muller et al., 2010), superficies endoteliales celulares (qC1qR), citoqueratina 1, receptor de la activación de sulfato de plasminógeno de urocinasa (u-PAR, CD87), cartílago articular, piel, ácidos grasos, endotoxina, proteoglicanos (heparano, sulfato de condroitina E, heparina de mastocitos) y proteínas amiloides (Schmaier, 2008). Una vez se ha activado FXII para formar FXIIa, existe una reacción de retroalimentación positiva en la que FXIIa activa FXII circulante. Están disponibles una variedad de inhibidores de FXII, que varían desde moléculas pequeñas hasta proteínas. Aunque FXII es el factor iniciador en la vía intrínseca, la deficiencia de factor XII no contribuye a una hemorragia debido a que la vía extrínseca (factor tisular) es la vía primaria para la formación de coágulos.

A pesar de su función bien establecida en la vía intrínseca, la función fisiológica del factor XII sigue sin estar clara (Schmaier, J. Clin. Invest. 2008; 118:3006-9; Stavrou & Schmaier, Thromb. Res. 2010). FXII participa en el proceso inflamatorio mediante la formación de bradiquinina mediante el sistema quinina-caliceína. La bradiquinina contribuye a los parámetros inflamatorios clásicos de rojez, calor, hinchazón y dolor, que son causados por la activación de células endoteliales para aumentar la permeabilidad vascular, producción de óxido nítrico y movilización de ácido araquidónico, así como estimular las terminaciones nerviosas sensoriales. También participa la trombosis patológica en la isquemia (Kleinschnitz et al., J. Exp. Med. 2006; 203:513-8). Otra función más de FXII es en la quimiotaxis, agregación y desgranulación de neutrófilos (Wachtfogel et al., 1986). También puede potenciar la producción de monocitos de la citocina pro-inflamatoria IL-1, y participar en el sistema del complemento.

Sumario de ciertas realizaciones

Así, FXII participa en múltiples vías complejas, pero sigue sin estar claro si FXII es esencial *in vivo* para cualquiera de estas vías. Por ejemplo, los seres humanos que son deficientes en FXII no padecen diátesis hemorrágica anormal, incluso durante procedimientos quirúrgicos mayores (Schmaier, J. Clin. Invest. 2008; 118:3006-9). Además, aunque FXII puede estar implicado en la deposición de fibrina, que se ha informado que se activa en EM (Marik et al. Brain 2007; 130:2800-15), y en la activación de bradiquinina que también puede contribuir a EM (Göbel et al. J. Autoimmunity 2011; 36:106-14), no está claro si es la vía dependiente de FXII la que causa estos efectos, u otra vía que comparte el mismo resultado final, tal como deposición de fibrina por la vía de coagulación extrínseca. Por consiguiente, actualmente se carece de la demostración directa de una función para FXII en cualquiera de las características patológicas de EM.

Aunque la función del factor XII (FXII) en la desmielinización inflamatoria fue previamente no reconocida, las realizaciones de la presente solicitud proporcionan inhibidores de FXII para prevenir, tratar o mejorar esclerosis múltiple y otras formas de desmielinización inflamatoria. La solicitud proporciona métodos de administración de un inhibidor de factor XII para prevenir, tratar, o de otro modo mejorar los efectos de una enfermedad inflamatoria neurológica, que incluye esclerosis múltiple. Un "inhibidor de FXII" se refiere a inhibidores de cualquiera o ambos del factor XII y factor XII activado (FXIIa).

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un inhibidor de factor XII para el uso para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad inflamatoria neurológica que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de factor XII (FXII) según la reivindicación 1.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el inhibidor de FXII puede comprender la secuencia de polipéptidos de infestina-4 no mutante (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma, en la que la

variante comprende: (a) los aminoácidos 2-13 del extremo N de SEQ ID NO: 2; y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácidos fuera de los aminoácidos del extremo N que dan como resultado diferencias de la secuencia de infestina-4 no mutante; y/o (b) seis restos de cisteína conservados; y homología de al menos 70 % con la secuencia de infestina-4 no mutante.

- 5 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el inhibidor de FXII puede comprender un anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo, en las que el anticuerpo se une a FXII e inhibe su actividad y/o activación.

En las realizaciones en las que el inhibidor de FXII es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender (a) una región VH que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 9, la CDR2 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 11, y la CDR3 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 13; y/o (b) una región VL que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 15, y la CDR3 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 17. En algunas de estas realizaciones, el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende (a) una región VH que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 9, la CDR2 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 10, y la CDR3 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 12; y/o (b) una región VL que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 15 y la CDR3 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 16. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región VH que comprende SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 8. En cualquiera de las realizaciones que implican un anticuerpo, el anticuerpo anti-FXII puede ser una IgG. En cualquiera de las realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-factor XII/XIIa o fragmento de unión al antígeno del mismo puede inhibir el factor XIIa-alfa humano más de 50 % cuando se usa en una relación molar de FXIIa-alfa con respecto al anticuerpo de 1:0,2.

- 25 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el inhibidor de FXII se puede unir a un polipéptido que potencia la semivida que es albúmina, afamina, alfa-fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, albúmina humana o una variante de la misma, una inmunoglobulina o una variante de la misma, PEG, o una variante de la misma, o un Fc de una IgG. En algunas de estas realizaciones, el polipéptido que potencia la semivida se une al inhibidor de FXII mediante un conector. En algunas de las realizaciones que implican un conector, el conector puede ser (a) escindible; (b) escindible por una proteasa de la coagulación de la vía de la coagulación intrínseca, extrínseca, o común; y/o (c) escindible por el factor XIIa.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, el inhibidor de FXII puede comprender una proteína de fusión albúmina humana-conector-FXII.

- 35 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, la enfermedad inflamatoria neurológica puede ser esclerosis múltiple (EM). En algunas de las realizaciones que implican EM, la EM puede ser esclerosis múltiple remitente recidivante. En otras realizaciones que implican EM, la EM puede ser esclerosis múltiple de primaria progresiva.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, la enfermedad inflamatoria neurológica puede ser mielitis transversa.

- 40 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención, la enfermedad inflamatoria neurológica puede ser neuromielitis óptica (enfermedad de Devic).

Los 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 pueden ser aprendidos en la práctica. Los objetos y ventajas de las realizaciones se manifestarán ellos mismos por medio de los elementos y combinaciones particularmente indicados en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta la secuencia de aminoácidos de infestina (SEQ ID NO: 1).

- La Figura 2 compara las secuencias de aminoácidos de infestina-4 (SEQ ID NO: 2), SPINK-1 (SEQ ID NO: 3) y tres variantes de SPINK-1 (K1 (SEQ ID NO: 4), K2 (SEQ ID NO: 5) y K3 (SEQ ID NO: 6)). * indica aminoácidos idénticos, y | indica aminoácidos similares con respecto a la secuencia de infestina-4. La secuencia de infestina-4 subrayada se usó para sustituir 15 aminoácidos de SPINK-1 para generar K1. Las variantes K2 y K3 se generaron mediante mutaciones puntuales adicionales (aminoácidos subrayados) en la secuencia K1.

La Figura 3 presenta la secuencia de aminoácidos de albúmina humana (SEQ ID NO: 19).

- La Figura 4A-D representan la puntuación de EAE de ratones en función del tiempo. La Fig. 4A presenta ratones FXII^{-/-} en comparación con ratones de control (Con). La Fig. 4B presenta ratones FXI^{-/-} en comparación

con ratones de control (Con). Las Figs. 4C y 4D presentan puntuaciones para ratones tratados con el inhibidor de FXII PCK en comparación con controles a partir del día de inmunización (Fig. 4C) o desde el día 12 (Fig. 4D).

La Figura 5A-5E resume los datos histológicos y funcionales *in vitro*. La Fig. 5A representa el número de focos inflamatorios, la Fig. 5B el área/sección desmielinizada y la Fig. 5C las cifras de axones en ratones de control (barra izquierda), tratados con PCK (barra central) y FXII^{-/-} (barra derecha). Ejemplos de comparaciones histológicas entre ratones de control (Con) y tratados con PCK se presentan para cada gráfico de barras. La Fig. 5D presenta la proliferación de esplenocitos en respuesta a la estimulación de CD3/CD28 o MOG. La Fig. 5E resume la secreción de citocinas en esplenocitos de ratones de control (barra izquierda), tratados con PCK (barra central) y FXII^{-/-} (barra derecha).

La Figura 6A presenta las puntuaciones de EAE en función del tiempo para ratones tratados con el inhibidor de FXII, rHA-infestina-4. La Fig. 6B compara los niveles de la citocina IL-17 en ratones de control (barra izquierda) frente a tratados con rHA-infestina-4 (barra derecha).

La Figura 7 presenta la puntuación de parálisis en función del tiempo para ratones tratados con un anticuerpo anti-factor XII (diamantes negros) o con un anticuerpo de control de isotipo (cuadrados blancos).

La Figura 8 presenta los niveles de citocinas en la sangre de ratones tratados con anti-FXII y de control para las citocinas GM-CSF, IFN γ , TNF α e IL-1 β .

Descripción detallada

Las realizaciones de la solicitud se refieren a métodos que comprenden administrar al menos un inhibidor de factor XII (FXII) a un paciente para prevenir, tratar, o de otro modo mejorar los efectos de una enfermedad inflamatoria neurológica.

Una ventaja de las realizaciones de la solicitud es que los inhibidores de FXII pueden tener un perfil de seguridad mejorado en comparación con otros fármacos, puesto que se espera que sean bien tolerados. Además, puesto que FXII participa en varias cascadas fisiológicas, una o más de las cuales pueden estar implicadas en las enfermedades desmielinizantes inflamatorias tales como EM, los inhibidores de FXII pueden tener un mejor perfil de eficacia en comparación con terapias diana individuales.

I. Enfermedades desmielinizantes inflamatorias

Un aspecto la invención se refiere a métodos de prevención, tratamiento, o de otro modo mejora de los efectos de una enfermedad desmielinizante inflamatoria, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo al menos un inhibidor de factor XII (FXII), para así prevenir, tratar o mejorar los efectos de la enfermedad inflamatoria neurológica. Por consiguiente, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de factor XII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en prevenir, tratar o mejorar los efectos de una enfermedad desmielinizante inflamatoria.

Como se usa aquí, los términos "tratan" y "tratar" no requieren una eliminación completa de síntomas, y estos términos no son equivalentes a "cura" o "curar". En su lugar, "tratan" y "tratar" significa que al menos un signo o síntoma de la enfermedad se ha reducido, inhibido, disminuido o retrasado. En algunas realizaciones, los signos o síntomas son uno o más de los criterios primarios o secundarios de valoración descritos más adelante. En ciertas realizaciones, "tratan" o "tratar" también pueden incluir mejorar los efectos de la enfermedad. En general, sin embargo, "mejorar los efectos" significa que mejora algún aspecto de la enfermedad que refleja una alteración de la función del paciente. Se pueden hacer evaluaciones funcionales usando criterios bien establecidos para la enfermedad, que incluyen el uso de la escala expandida del estado de discapacidad de Kurtzke (EDSS) (Kurtzke JF, Neuroepidemiol. 2008; 31:1-9) para esclerosis múltiple (EM), como se describe más adelante. "Prevenir", como se usa aquí, significa cualquier administración de terapia a un sujeto que se conoce que está en riesgo de desarrollar una enfermedad desmielinizante inflamatoria o, en aquellas enfermedades que remiten y luego recaen, "prevenir" puede significar inhibir la recaída en un paciente que está en remisión. Como se indica más adelante para EM, "prevenir" también significa que un paciente cumple algunos, pero no todos, de los criterios de diagnóstico para EM, pero no progresa hacia enfermedad abierta que cumple completamente los criterios de diagnóstico.

Los términos "enfermedad inflamatoria neurológica" y "enfermedad desmielinizante inflamatoria" se usan esencialmente indistintamente para referirse a una afección en un paciente humano, o en un animal, en el que existe inflamación de una o más áreas del cerebro o la médula espinal. Los términos no son completamente equivalentes, sin embargo, y el experto apreciará que una enfermedad inflamatoria neurológica no requiere necesariamente desmielinización, aunque la desmielinización frecuentemente se desarrolla tras la inflamación. La esclerosis múltiple es un ejemplo de una enfermedad desmielinizante inflamatoria en seres humanos. En una variedad de animales, que incluyen ratones, ratas y monos, la desmielinización inflamatoria se puede inducir experimentalmente por varias estrategias de inmunización diferentes que son bien conocidas y son aceptadas como modelos de enfermedad humana (revisado en Krishnamoorthy & Wekerle, Eur. J. Immunol 2009; 39:2031-35). Dos estrategias de inmunización diferentes se presentan en los ejemplos. La enfermedad inducida resultante, la encefalomiелitis

autoinmune experimental (EAE), es otro ejemplo de una enfermedad desmielinizante inflamatoria, no obstante, una enfermedad experimental y, por consiguiente, confinada a sujetos no humanos.

En algunas realizaciones, la enfermedad desmielinizante inflamatoria es una enfermedad del sistema nervioso central (SNC). Enfermedades a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, mielitis transversa y neuromielitis óptica (enfermedad de Devic).

En algunas realizaciones, la enfermedad desmielinizante inflamatoria es una enfermedad del sistema nervioso periférico. Las enfermedades a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Miller Fisher y neuropatía periférica anti-MAG.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos de prevención, tratamiento, o mejora de los efectos de la esclerosis múltiple, que comprenden administrar a un sujeto en necesidad de los mismos una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de factor XII, previniendo así o tratando la esclerosis múltiple o mejorando los efectos de la esclerosis múltiple. Por consiguiente, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de factor XII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en prevenir o tratar esclerosis múltiple, o para mejorar los efectos de la esclerosis múltiple.

En las realizaciones que implican esclerosis múltiple, los sujetos con EM se pueden diagnosticar usando los "criterios de McDonald", que se basan en resonancia magnética nuclear (RMN) acoplada a la presentación clínica (Polman et al., Ann Neurol 2011; 69:292-302). Generalmente, se considera que un paciente que presenta dos o más ataques o dos o más lesiones clínicas objetivas tiene EM sin necesidad de evidencia clínica adicional. En pacientes con menos ataques o menos lesiones demostrables, el diagnóstico se basa en la demostración objetiva de la diseminación de las lesiones en el espacio y/o el tiempo por manifestaciones clínicas o clínicas y de diagnóstico (RMN). La evidencia clínica de la diseminación de lesiones en el espacio se demuestra por una o más lesiones T2 en al menos dos de cuatro de las siguientes áreas del sistema nervioso central: periventricular, yuxtacortical, infratentorial, o médula espinal. La diseminación de lesiones en el tiempo se demuestra por cualquier de una nueva lesión T2 y/o que se potencia por gadolinio tras la RMN de seguimiento o la presencia simultánea de lesiones asintomáticas que se potencian y que no se potencian por gadolinio en cualquier momento. La EM progresiva primaria se diagnostica en sujetos con un año de progresión de la enfermedad (incluyendo retrospectiva), más dos o más de: A) evidencia de diseminación en el espacio basada en una o más lesiones T2 en el cerebro en al menos un área característica de EM (periventricular, yuxtacortical o infratentorial), o B) evidencia de diseminación en el espacio en la médula espinal basada en más de dos lesiones T2, y C) la presencia de bandas oligoclonales y/o elevado índice de IgG en el líquido cefalorraquídeo (Polman et al., Ann Neurol 2011; 69:292-302).

En algunas realizaciones, el paciente tiene, o ha tenido, al menos un ataque clínico o al menos una lesión clínica objetiva, pero no ha presentado suficiente número de ataques clínicos y lesiones clínicas objetivas para establecer un diagnóstico de esclerosis múltiple usando los criterios de McDonald. Dicho paciente es un paciente "en riesgo" de esclerosis múltiple y se puede usar la administración de un inhibidor de FXII a un paciente que está "en riesgo" de EM para prevenir la EM en el sentido de que el sujeto no progrese hasta el punto de que un diagnóstico de EM se pueda hacer bajo los criterios de McDonald. Por consiguiente, en una realización se proporciona un método de prevención de esclerosis múltiple que comprende administrar al menos un inhibidor de FXII a un sujeto en riesgo de esclerosis múltiple, previniendo así la esclerosis múltiple. Asimismo, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de factor XII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en prevenir la esclerosis múltiple en un sujeto en riesgo de esclerosis múltiple.

En las realizaciones que implican un sujeto que ha sido diagnosticado con esclerosis múltiple, los sujetos se pueden clasificar además basándose en el transcurso de la enfermedad en sujetos con EM (1) remitente recidivante, (2) progresiva secundaria, (3) progresiva primaria, y (4) recidivante progresiva.

Así, la invención proporciona en ciertas realizaciones métodos de prevención, tratamiento o mejora de los efectos de la esclerosis múltiple, que comprenden administrar a un paciente diagnosticado con EM remitente recidivante una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de factor XII, previniendo así o tratando la EM remitente recidivante o mejorando los efectos de la EM remitente recidivante. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de factor XII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en prevenir, tratar o mejorar los efectos de la esclerosis múltiple remitente recidivante.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona métodos de prevención, tratamiento o mejora de los efectos de la esclerosis múltiple, que comprenden administrar a un paciente diagnosticado con EM progresiva secundaria una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de factor XII, previniendo así o tratando la EM progresiva secundaria o mejorando los efectos de la EM progresiva secundaria. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de factor XII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en prevenir, tratar o mejorar los efectos de la esclerosis múltiple progresiva secundaria.

En otras realizaciones más, la invención proporciona métodos de prevención, tratamiento o mejora de los efectos de la esclerosis múltiple, que comprenden administrar a un paciente diagnosticado con EM progresiva primaria una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de factor XII, previniendo así o tratando la EM progresiva primaria o mejorando los efectos de la EM progresiva primaria. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de factor XII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en prevenir, tratar o mejorar los efectos de la esclerosis múltiple progresiva primaria.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona métodos de prevención, tratamiento o mejora de los efectos de la esclerosis múltiple, que comprende administrar a un paciente diagnosticado con EM recidivante progresiva una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de factor XII, previniendo así o tratar la EM recidivante progresiva o mejorando los efectos de a EM recidivante progresiva. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de factor XII y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en prevenir, tratar o mejorar los efectos de la esclerosis múltiple recidivante progresiva.

Un ejemplo de la mejora de los efectos de o tratamiento de cualquiera de los tipos de EM es una reducción en el estado de discapacidad del sujeto o un aumento en el tiempo hasta la progresión de la discapacidad. El estado de discapacidad se puede evaluar (o puntuar) usando la escala expandida del estado de discapacidad de Kurtzke (EDSS) (Kurtzke JF, *Neuroepidemiol* 2008; 31:1-9). Por ejemplo, un inhibidor reduce la escala de discapacidad si reduce el tiempo hasta la aparición del "aumento sostenido en la discapacidad", definido como un aumento de al menos 1 punto en la EDSS desde EDSS inicial $\geq 1,0$ que se mantuvo durante 12 semanas, o al menos un aumento de 1,5 puntos en la EDSS desde EDSS inicial=0 que se mantuvo durante 12 semanas. Otros ejemplos de mejora de los efectos de o tratamiento de cualquiera de los tipos de EM se pueden medir por RMN: por ejemplo, una disminución en la mediana del número de lesiones hiperintensas T2 nuevas o que se agrandaron recientemente durante un periodo definido, por ejemplo, 12, 24, 36 o 48 meses; o una disminución en el número de lesiones T1 potenciadas por gadolinio durante un periodo definido, por ejemplo, 12, 24, 36 o 48 meses.

En general, los criterios que se pueden usar para mostrar que un inhibidor de FXII según la invención está tratando EM o mejorando los efectos de la EM incluyen los siguientes resultados, tanto solos como en cualquier subcombinación: una disminución en el grado del número de lesiones de RMN que se potencian por contraste; una disminución en el índice de acumulación sostenida de discapacidad (SAD); una disminución en la aparición de recaída; un aumento en el tiempo hasta la recaída; un aumento en la proporción de pacientes que están libres de recaída en, por ejemplo, 1, 2, 3 o más años después del tratamiento inicial; una disminución en la tasa de atrofia cerebral en una gammagrafía cerebral; una disminución en el volumen de lesiones T2 por RMN; cambio en los niveles de osteopontina del líquido cefalorraquídeo ("LCR"); mejora en la escala expandida del estado de discapacidad (EDSS); mejora en la prueba cronometrada de la marcha de 25 pies (T25FW); mejora en la puntuación de alteración por esclerosis múltiple (MSIS); mejora en la encuesta de salud del formulario breve compuesto funcional de esclerosis múltiple (SF36); una mejora en los niveles de cadena pesada de neurofilamento en el líquido cefalorraquídeo; una mejora en los niveles de proteína básica de mielina en líquido cefalorraquídeo; una mejora en el volumen normalizado de cerebro (NBV), volumen de materia gris (GMV) y/o volumen de materia blanca (WMV); una mejora en la relación de transferencia de magnetización (MTR) en el cerebro completo, lesiones, materia gris de aspecto normal (NAGM) o materia blanca de aspecto normal (NAWM); una mejora en las imágenes de transferencia por difusión (DTI) en FA y ADC en lesiones, GM y NAWM; una mejora en el número de células de LCR; una mejora en un índice de IgG; una mejora en los metabolitos de óxido de nitrógeno de LCR; una mejora en el cociente de concentración de albúmina de suero en LCR; una mejora en los niveles de CXCL13 en LCR; una mejora en los niveles de metaloproteinas-9 de la matriz (MMP-9); una disminución en las nuevas lesiones que se potencian por gadolinio (GdEL); una disminución en el volumen de lesiones en imágenes de RMN ponderadas con T2, una disminución en el número de nuevas lesiones o lesiones que aumentan en las imágenes de RMN ponderadas con T2; cualquier combinación de estos criterios; o cualquier subcombinación de estos criterios. Para cualquiera de los criterios, los criterios se pueden determinar con respecto al momento en el que empezó el tratamiento.

En las realizaciones que implican una forma recidivante de EM, un inhibidor de FXII según la invención también trata o mejora la EM si reduce la tasa de recaída anualizada o aumenta el porcentaje de pacientes sin recaída durante un periodo definido, tal como, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses o 60 meses (o durante cualquier tiempo intermedio).

Se puede usar el modelo de EAE para determinar si un inhibidor de FXII particular prevendrá, tratará o mejorará la esclerosis múltiple. Los modelos de EAE son modelos animales aceptados de EM y se han usado para desarrollar fármacos autorizados por la FDA para el tratamiento de esclerosis múltiple (por ejemplo, Stüve et al., *Arch. Neurol.* 2010; 67:1307-15; Yednock et al., *Nature* 1992). Por consiguiente, si un inhibidor de FXII particular muestra actividad en uno o más modelos de EAE, tales como aquellos descritos en los ejemplos, el experto esperaría que un inhibidor de FXII también mostrara actividad en prevenir, tratar o mejorar los efectos de la esclerosis múltiple. Merece la pena indicar, sin embargo, que la inactividad en un modelo de EAE no excluye actividad en la esclerosis múltiple. Por ejemplo, un tratamiento temprano para EM, interferón beta, no fue muy eficaz en el modelo de EAE (Stüve et al., *Arch. Neurol.* 2010; 67:1307-15.)

II. Inhibidores de FXII

Los términos "factor XII" y "FXII" se refieren cada uno a cualquiera o ambos del factor XII y factor XII activado (FXIIa). Así, el "inhibidor de FXII" incluye inhibidores de cualquiera o ambos de FXII y FXIIa. Además, los anticuerpos anti-FXII incluyen anticuerpos que se unen a e inhiben cualquiera o ambos de FXII y FXIIa. El término "inhibidor de FXII" también pretende incluir un inhibidor de FXII que se asocia a un polipéptido que prolonga la semivida, que en algunas realizaciones incluye un conector.

En algunas realizaciones, el inhibidor de FXII es un inhibidor de FXII directo. El término inhibidor "directo" significa un inhibidor que actúa mediante el contacto (por ejemplo, unión) con FXII (o FXIIa). A diferencia, un inhibidor indirecto puede actuar sin ponerse en contacto con proteína FXII (o FXIIa); por ejemplo, se puede usar un ARN antisentido para reducir la expresión del gen FXII, pero no interacciona directamente con la proteína FXII. Así, un inhibidor indirecto, a diferencia de un inhibidor directo, actúa aguas arriba o aguas abajo de la proteína FXII. Algunos ejemplos de inhibidores directos se presentan a continuación. Los inhibidores de FXII generalmente son inhibidores no endógenos; es decir, no son inhibidores que ocurren naturalmente en el cuerpo de un sujeto con enfermedad desmielinizante inflamatoria.

A. Infestina-4

En una realización, la solicitud proporciona un inhibidor de FXII que comprende el dominio 4 de infestina, "infestina-4". Recientemente, se informó que la infestina-4 era un novedoso inhibidor de FXII activado (FXIIa). Las infestinas son una clase de inhibidores de la serina proteasa derivados del estómago 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 usa estos inhibidores para prevenir la coagulación de la sangre ingerida. La secuencia de polipéptidos precursora de longitud completa de la infestina se proporciona en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). El gen de infestina codifica 4 dominios que dan como resultado proteínas que pueden inhibir diferentes factores en la vía de coagulación. En particular, el dominio 4 codifica una proteína (infestina-4) que es un inhibidor fuerte de FXIIa. La infestina-4 se ha administrado en ratones sin complicaciones hemorrágicas (documento WO 2008/098720; Hagedorn et al., Circulation 2010; 121:1510-17.)

Por consiguiente, en una realización, se proporciona un inhibidor de FXII que 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. Se conoce que estas proteínas son potentes inhibidores de FXII (véase el documento WO 2008/098720; también véase Campos ITN et al. 577 FEBS Lett. 512-516, 2004). En una realización, el inhibidor de FXII es una construcción de infestina-4 marcada con (His)₆. En otra realización, el inhibidor de FXII es una proteína de fusión que consiste en albúmina-conector-infestina-4. En una realización, la albúmina-conector-infestina-4 es la proteína rHA-infestina-4 descrita en Hagedorn et al. Circulation 2010; 117:1153-60. Ejemplos de inhibidores de FXII de infestina se describen en el documento WO 2008/098720 y Hagedorn et al. Circulation 2010; 117:1153-60.

Como se usa aquí, el término "variante" de infestina se refiere a un polipéptido con una mutación de aminoácido, en la que la "mutación" se define como una sustitución, una delección o una adición, a la secuencia de infestina-4 no mutante, en la que dichos cambios no alteran la capacidad funcional del polipéptido para inhibir FXII. El término "variante" incluye fragmentos de la secuencia de infestina-4 no mutante o mutada. Ejemplos adicionales de dichas variantes se proporcionan más adelante.

En una realización, una variante de infestina-4 comprende la secuencia de aminoácidos VRNPCACFRNYV (restos 2-13 de SEQ ID NO: 2) desde el extremo amino de la secuencia de infestina-4 no mutante (véase la secuencia subrayada en la Figura 2), y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácido fuera de los aminoácidos del extremo N que dan como resultado diferencias de la secuencia de infestina-4 no mutante, y/o seis restos de cisteína conservados, y/u homología de al menos 70 % con la secuencia de infestina-4 no mutante. Por tanto, en algunas realizaciones, una variante de infestina-4 comprende la región conservada del extremo N de los aminoácidos 2-13 de la secuencia de infestina-4 no mutante, y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácido fuera de estos aminoácidos conservados del extremo N que dan como resultado diferencias de la secuencia de infestina-4 no mutante. Como se usa aquí, el término "aminoácidos fuera del extremo N" de una variante de infestina se refiere a cualquier aminoácido a lo largo de la cadena de polipéptidos de la variante distinto de la extensión contigua de aminoácidos que comprende la secuencia VRNPCACFRNYV, es decir, los aminoácidos 2-13 de SEQ ID NO: 2. En otra realización, una variante de infestina-4 comprende seis restos de cisteína conservados y tiene homología de al menos 70 % con la secuencia de infestina-4 no mutante. En una realización, los seis restos de cisteína conservados son aminoácidos en las posiciones 6, 8, 16, 27, 31 y 48 de la secuencia de infestina-4 no mutante, SEQ ID NO: 2 (véase la Figura 2). En una realización, la variante comprende la cisteína conservada final en la posición 48. En otras realizaciones, las posiciones exactas de los restos de cisteína, y las posiciones relativas entre sí pueden cambiar de las posiciones 6, 8, 16, 27, 31 y 48 de la secuencia de infestina-4 no mutante 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 %, o cualquier porcentaje entre la homología con la secuencia de infestina-4 no mutante.

En una realización, el inhibidor de FXII comprende una variante de la secuencia de polipéptidos de infestina-4 no mutante (SEQ ID NO: 2), en la que la variante comprende los aminoácidos 2-13 del extremo N de SEQ ID NO: 2; dando como resultado al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácido fuera de dichos aminoácidos de extremo N diferencias de la secuencia de infestina-4 no mutante; seis restos de cisteína conservados; y homología de al menos 70 % con la secuencia de infestina-4 no mutante.

En las realizaciones de las variantes de infestina-4, una variante de infestina-4 se caracteriza por que inhibe FXII. La actividad funcional para inhibir FXII se puede evaluar, por ejemplo, mediante la caracterización *in vitro* y/o *in vivo*, que incluye ensayos directos para probar la inhibición de la actividad enzimática de FXII, tiempo de coagulación prolongado, es decir, tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT); una prueba de coagulación clínica que trata la vía de coagulación intrínseca), o métodos *in vivo* que evalúan la coagulación.

B. Anticuerpos FXII

En otras realizaciones, el inhibidor de FXII es un anticuerpo anti-FXII que se une a FXII e inhibe la activación y/o actividad de FXII. Los anticuerpos anti-FXII se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 2006/066878, y en Ravon et al., 1 Blood 4134-43, 1995. Otros anticuerpos monoclonales (mAbs) contra el factor XII humano incluyen el mAb B7C9 descrito por Pixley et al. (J Biol Chem 1987; 262, 10140-45), un mAb descrito por Small et al (Blood 1985; 65:202-10); los mAb F1 y F3 descritos por Nuijens et al. (J. Biol. Chem. 1989; 264:12941-49); los mAbs B6F5, C6B7 y D2E10 contra la cadena ligera de FXII descritos en el documento WO89/11865; un mAb que se une selectivamente a FXIIa-β con respecto a FXII descrito en el documento WO90/08835; y el anticuerpo anti-FXII OT-2 descrito en el documento WO91/17258.

Los anticuerpos monoclonales anti-factor XII/FXIIa adicionales y el fragmento de unión al antígeno de los mismos se describen en la solicitud provisional de EE.UU. Nº 61/510.801, presentada el 22 de julio de 2011, que se incorpora en el presente documento como referencia. Los anticuerpos tienen una afinidad de unión más de 2 veces mayor por el factor XIIa-beta humano que por el factor XII humano y son capaces de inhibir la actividad amidolítica del factor XIIa humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene una o más de las siguientes características: (a) se une a FXII/FXIIa murino; (b) comprende una región de la cadena pesada variable (VH) que es más de 85 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 7; (c) comprende una región de la cadena ligera variable (VL) que es más de 85 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 8; (d) comprende la CDR1 de la cadena pesada al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 9, y/o la CDR2 de la cadena pesada al menos 60 % idéntica a SEQ ID NO: 10, y/o la CDR3 de la cadena pesada al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 12; (e) comprende la CDR1 de la cadena ligera al menos 50 % idéntica a SEQ ID NO: 14, y/o la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 15, y/o la CDR3 de la cadena ligera con la secuencia A-X₁-W-X₂-X₃-X₄-X₅-R-X₆-X₇ en la que X₁ puede ser A o S, X₅ puede ser L o V, los otros X_n pueden ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 17); (f) se une al factor XIIa-beta humano con una K_D mejor que 10⁻⁸ M; (g) compite con infestina-4, para unirse al factor XIIa-beta humano; o (h) es una IgG humana o variante de la misma, preferentemente IgG4 humana o variante de la misma.

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-FXII es un anticuerpo contra IgG que se une a FXII humano y comprende (a) una región VH que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 9, la CDR2 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 11 y la CDR3 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 13; y/o (b) una región VL que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 15 y la CDR3 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 17. Una CDR2 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11 comprende la secuencia GIX₁X₂X₃X₄X₅X₆TVYADSVKG, en la que X₁ es R, N o D, X₂ es P, V, I o M; X₃ es S, P o A; X₄ es G, L, V o T; X₅ puede ser cualquier aminoácido, preferentemente X₅ es G, Y, Q, K, R, N o M; y X₆ es T, G o S. Una CDR3 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 13 comprende la secuencia ALPRSGYLX₁X₂X₃X₄YYYYALDV, en la que X₁ es I, M o V; X₂ es S o K; X₃ es P, K, T o H; y X₄ es H, N, G o Q. Una CDR3 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 17 comprende la secuencia AX₁WX₂X₃X₄X₅RX₆X₇, en la que X₁ es A o S; X₂ es D, Y, E, T, W, E o S; X₃ es A, N, I, L, V, P, Q o E; X₄ es S, D, P, E, Q o R; X₅ es L o V; X₆ es G, L o K; y X₇ es V, A, D, T, M o G.

En otras realizaciones, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo anti-FXII es un fragmento de un anticuerpo contra IgG que se une a FXII humano y comprende (a) una región VH que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 9, la CDR2 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 10 y la CDR3 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 12; y/o (b) una región VL que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 15 y la CDR3 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 16.

En una realización, el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo es el anticuerpo "3F7" usado en el Ejemplo 3. Las secuencias de las regiones variables y CDR de 3F7 se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1.

Región	Secuencia de aminoácidos
VH	EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYIMQWVR QAPGKGLEWVSGIRPSGGTTVYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALPRSGYLISPHYYYA LDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 7)
VL	QSELTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSSSNIGRNYVYWYQ QVPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVIS GLRSEDEADYYCAAWDASLRGVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 8)
HCDR 1 (<i>Kabat 31-35</i>)	KYIMQ (SEQ ID NO: 9)
HCDR 2 (<i>Kabat 50-65</i>)	GIRPSGGTTVYADSVKG (SEQ ID NO: 10)
HCDR 3 (<i>Kabat 95-102</i>)	ALPRSGYLISPHYYYALDV (SEQ ID NO: 12)
LCDR 1 (<i>Kabat 24-34</i>)	SGSSSNIGRNYVY (SEQ ID NO: 14)
LCDR 2 (<i>Kabat 50-56</i>)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 15)
LCDR 3 (<i>Kabat 89-97</i>)	AAWDASLRGV (SEQ ID NO: 16)

En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno se elige de los anticuerpos VR115, VR112, VR24, VR110, VR119 madurados por afinidad (con respecto a 3F7).

mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
3F7	9	10	12	14	15	16
VR119	9	11	12	14	15	16
VR112	9	11	12	14	15	16
VR115	9	11	12	14	15	16
VR24	9	10	12	18	15	16
VR110	9	11	12	14	15	16

5

Como se observa anteriormente, SEQ ID NO: 11 es una secuencia degenerada. VR119 comprende SEQ ID NO: 11 en la que X₁ es N, X₂ es V, X₃ es P; X₄ es L, X₅ Y; y X₆ es G. VR112 comprende SEQ ID NO: 11 en la que X₁ es N, X₂ es V, X₃ es P, X₄ es V, X₅ es Q y X₆ es G. VR115 comprende SEQ ID NO: 11 en la que X₁ es D, X₂ es I, X₃ es P, X₄ es T, X₅ es K y X₆ es G. VR110 comprende SEQ ID NO: 11 en la que X₁ es D, X₂ es M, X₃ es P, X₄ es T, X₅ es K y X₆ es G. VR24 comprende una LCDR1 única: SGSSEMTVHHYVY (SEQ ID NO: 18).

10

En realizaciones que implican CDR de anticuerpos, las CDR se definen según el sistema de numeración de KABAT (Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a edn. U.S. Department of Health and Human services, NIH, Bethesda, MD).

15

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal anti-factor XII/FXIIa o fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe el factor XIIa-alfa más de 40 %, más de 50 %, o más de 60 %, cuando se usa en una relación molar de FXIIa-alfa con respecto a anticuerpo de 1:0,2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo inhibe el factor XIIa-alfa más de 80 %, más de 85 %, o más de 90 %, a una relación molar de FXIIa-alfa con respecto a anticuerpo de 1:0,5. En una realización, el anticuerpo logra la inhibición completa de FXIIa-alfa a una relación molar de 1:0,5. En una realización,

FXIIa-alfa es el factor XIIa-alfa humano. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una afinidad por FXIIa humano que es al menos comparable al anticuerpo 3F7.

Como se trata anteriormente, un "anticuerpo anti-FXII" incluye anticuerpos que se unen a e inhiben cualquiera o ambos de FXII y FXIIa. En una realización, el 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 se puede caracterizar en que el isotipo es IgM, IgD, IgA, IgG o IgE, o cualquier subclase de los mismos, tal como IgG₁, o sus variantes. El anticuerpo puede ser de una especie de mamífero, que incluye, pero no se limita a, humana, ratón, rata, conejo, cabra, hámster o mono. El anticuerpo se puede humanizar o injertar en CDR. El anticuerpo se puede mutar o modificar para alterar la inmunogenicidad, semivida, o para conferir otras propiedades ventajosas asociadas a un anticuerpo terapéutico. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-FXII que se une a un epítipo en la cadena pesada o cadena ligera de FXII (en la que "FXII" incluye FXII y FXIIa), tal como un epítipo neutralizante. El anticuerpo puede tener alta afinidad y/o alta avidez para unirse a FXII. El anticuerpo se puede conjugar con un polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña.

En otra realización, el inhibidor de FXII es una proteína, péptido, ácido nucleico o molécula pequeña. El término "molécula pequeña" se refiere a un compuesto de bajo peso molecular. Una molécula pequeña puede ser, por ejemplo, inferior a 1000 dáltones, que permite la difusión a través de membranas celulares. Una molécula pequeña se puede caracterizar por que se une con alta afinidad a FXII. Una molécula pequeña preferida es una que se puede absorber del tubo GI.

C. Inhibidores de FXII asociados a polipéptidos potenciadores de la semivida

Otro aspecto de la solicitud proporciona inhibidores de FXII asociados a un polipéptido potenciador de la semivida (HLEP). En una realización, los inhibidores de FXII son proteínas pequeñas. Por tanto, se puede esperar una rápida eliminación renal como se publica para otras proteínas pequeñas (Werle M y Bernkop-Schnurch A, Amino Acids 2006; 30:351-367). Una forma de tratar una semivida en plasma corta de un compuesto polipeptídico es inyectarlo repetidamente o mediante infusión continua. Otro enfoque es aumentar la semivida en plasma intrínseca del propio polipéptido. Por ejemplo, en una realización, se asocian inhibidores de FXII con proteínas que prolongan la semivida.

Un "polipéptido potenciador de la semivida" aumenta la semivida del inhibidor de FXII *in vivo* en un paciente o en un animal. Por ejemplo, se han descrito albúmina e inmunoglobulinas y sus fragmentos o derivados como polipéptidos potenciadores de la semivida (HLEP). Ballance et al. (documento WO 2001/79271) describieron polipéptidos de fusión de una multitud de diferentes polipéptidos terapéuticos que, cuando se fusionan con albúmina de suero humano, se predice que tienen una elevada semivida funcional *in vivo* y prolongada estabilidad en almacén.

Los términos "albúmina" y "albúmina de suero" engloban albúmina humana (HA) y variantes de la misma, cuya forma madura completa se administra (SEQ ID NO: 19), así como albúmina de otras especies y sus variantes. Como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere a un polipéptido de albúmina o secuencia de aminoácidos, o una variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. Como se usa en el presente documento, la albúmina es capaz de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica de un inhibidor de FXII. La albúmina puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo humano, mono, vaca, oveja, o cerdo. Las albúminas no de mamífero incluyen, pero no se limitan a, albúmina de gallina y salmón. La porción de albúmina del polipéptido asociado 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 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 de la secuencia de albúmina humana (HA) (por ejemplo, la secuencia expuesta en la Figura 3, SEQ ID NO: 19 o puede incluir parte o todos los dominios específicos de HA. Una variante de albúmina puede incluir una sustitución, delección o adición de aminoácidos, tanto sustitución conservativa como no conservativa, en la que dichos cambios no alteran sustancialmente el sitio activo, o dominio activo, que confiere las actividades terapéuticas de los polipéptidos potenciadores de la semivida. Estas variantes pueden compartir 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o cualquier porcentaje intermedio de homología.

En una realización, la variante de albúmina incluye fragmentos y puede consistir en o alternatively comprender al menos un dominio de albúmina completo o fragmentos de dichos dominios, por ejemplo los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 19), 2 (aminoácidos 195-387 de SEQ ID NO: 19), 3 (aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 19), 1 + 2 (1-387 de SEQ ID NO: 19), 2 + 3 (195-585 de SEQ ID NO: 19) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de SEQ ID NO: 19 + aminoácidos 388-585 de SEQ ID NO: 19). Cada dominio está él mismo constituido por dos subdominios homólogos, concretamente los restos 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, de SEQ ID NO: 19, con regiones de conector flexible inter-subdominios que comprenden los restos Lys106 a Glu119, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511.

En otra realización, se pueden usar como HLEP otras proteínas que están estructuralmente o evolutivamente relacionadas con la albúmina, que incluyen, pero no se limitan 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 proteína de unión de vitamina D (Cooke y David, 76 J. Clin. Invest. 2420-2424, 1985). Sus genes representan un complejo mutigénico con similitudes estructurales y funcionales que se mapean con la misma región cromosómica en seres humanos, ratones y ratas. La similitud estructural de los miembros de la familia de albúmina sugiere que se pueden usar como HLEP. Por ejemplo, se ha reivindicado que la alfa-fetoproteína prolonga la semivida de un polipéptido terapéutico unido *in vivo* (documento WO 2005/024044). Se pueden usar dichas proteínas, o sus variantes, que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica, y pueden derivar de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo humano, mono, vaca, oveja o cerdo, o no mamífero que incluye, pero no se limita a, gallina o salmón (véase el documento WO 2008/098720). Dichas variantes pueden ser de 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de proteínas respectiva o pueden incluir parte o todos los dominios específicos de las proteínas respectivas. Las proteínas de fusión de miembros de la familia de albúmina pueden incluir variantes polimórficas que existen de forma natural.

En una realización, se pueden usar restos de mono- o poli- (por ejemplo, 2-4) polietilenglicol (PEG) para prolongar las semividas. Se puede llevar a cabo PEGilación por cualquiera de las reacciones de PEGilación disponibles. Los métodos de preparación de un producto de proteína PEGilado generalmente incluirán (a) hacer reaccionar un polipéptido con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o aldehído derivado de PEG) en condiciones por las cuales la proteína se une a uno o más grupos PEG; y (b) obtener el (los) producto(s) de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas serán determinadas caso por caso basándose en los parámetros conocidos y el resultado deseado. Existen varios métodos de unión de PEG conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 401 384; Malik et al., Exp. Hematol., 20:1028-1035 (1992); Francis, Focus on Growth Factors, 3(2):4-10 (1992); documentos EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; la patente de EE.UU. N° 5.252.714.

En otra realización, se puede usar una inmunoglobulina (Ig), o sus variantes, como HELP, en la que una variante incluye fragmentos. En una realización, se usan el dominio Fc o porciones de la región constante de inmunoglobulina. La región constante puede ser al de una inmunoglobulina IgM, IgG, IgD, IgA o IgE. La porción de polipéptido terapéutico se conecta a la Ig mediante la región bisagra del anticuerpo o un conector peptídico, que puede ser escindible. Varias patentes y solicitudes de patente describen la fusión de proteínas terapéuticas con regiones constantes de inmunoglobulina para prolongar la semivida de proteínas terapéuticas *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 tanto, otra realización es usar dichas secuencias de inmunoglobulina, por ejemplo, fragmentos Fc de inmunoglobulinas y sus variantes, como HLEP. Los inhibidores de FXII se puede fusionar con dominios Fc o al menos porciones de regiones constantes de inmunoglobulina como HLEP y se pueden producir como moléculas recombinantes en células hospedadoras procariotas o eucariotas, tales como líneas de células de bacterias, levadura, plantas, animales (incluyendo insectos) o humanas o en animales transgénicos (documento WO 2008/098720).

Un ejemplo de una proteína de fusión de Fc mutante de SPINK, la proteína de fusión SPINK-K2-Fc, se describe en el documento WO2008/098720.

A. Conectores

En una realización, se puede introducir un conector peptídico intermedio en el polipéptido terapéutico y HLEP. En una realización, se introduce un conector escindible, particularmente si el HLEP interfiere con la actividad específica del polipéptido terapéutico, por ejemplo por impedimento estérico. En ciertas realizaciones, el conector se escinde 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 de contacto, que incluyen, por ejemplo, FXIIa, FXIa o FIXa. En una realización, el conector se escinde 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 incluyen proteasas implicadas en la conversión de fibrinógeno en fibrina, por ejemplo, FXa, FIIa y FXIIIa.

B. Formulación terapéutica y administración

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

El inhibidor de FXII purificado se puede disolver en disoluciones de tampón acuosas fisiológicamente compatibles convencionales a las que se pueden añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas de prevención, tratamiento o mejora de los efectos de la enfermedad desmielinizante inflamatoria en un paciente. Dichos vehículos y excipientes farmacéuticos, así como las formulaciones farmacéuticas adecuadas, se conocen bien 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 soluble liofilizada o estable. El polipéptido se puede liofilizar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las

formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o disolución estéril de solución salina fisiológica.

5 Las formulaciones del inhibidor de FXII se administran al paciente por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen los diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar la composición por cualquier vía conveniente. Las composiciones se pueden administrar por vía sistémica, tal como por vía parenteral. El término "parenteral", como se usa aquí, incluye inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intrarterial e intratraqueal; así como instilación, aplicación por spray y técnicas de infusión. Las formulaciones parenterales se pueden administrar por vía intravenosa o por vía subcutánea, ya sea en forma de bolo o como una infusión constante, según procedimientos conocidos. Los vehículos líquidos preferidos, que se conocen bien para uso parenteral incluyen agua estéril, solución salina, dextrosa acuosa, disoluciones de azúcar, etanol, glicoles y aceites. Para uso sistémico, las proteínas terapéuticas se pueden formular para una línea intravenosa o una línea arterial. Las formulaciones se pueden administrar continuamente por infusión o por inyección en bolo.

15 En algunas realizaciones, las formulaciones se administran por inyección intratecal o por inyección intracraneal, de manera que se obtiene acceso directo a la médula espinal y el cerebro. En estas realizaciones, la formulación puede ser especialmente formulada; por ejemplo, la formulación puede carecer de conservantes.

20 En algunas realizaciones, la formulación se administra mediante administración intranasal. Se ha informado que la administración intranasal permite la entrada directa de virus y macromoléculas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o SNC. Mathison et al. J. Drug Target 1998; 5:415-41; Chou et al. Biopharm Drug Dispos. 1997; 18:335-46; Draghia et al., Gene Ther. 1995; 2(6):418-235. En una realización, un vector viral, tal como un vector de adenovirus, que comprende un gen que codifica cualquiera de los inhibidores de FXII que son proteínas, se puede administrar mediante neuronas receptoras olfativas para obtener la expresión de la proteína codificada en el cerebro. Draghia et al., Gene Ther. 1995; 2(6):418-23.

25 Los comprimidos y cápsulas para administración por vía oral pueden contener excipientes convencionales tales como aglutinantes, cargas, lubricantes o agentes humectantes, etc. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de suspensiones acuosas o aceitosas, disoluciones, emulsiones, jarabes, elixires o similares, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado para su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. Algunas formulaciones engloban sistemas de liberación lenta, tales como un parche.

35 La dosis del inhibidor de FXII puede depender de muchos factores tales como, por ejemplo, la indicación, formulación, o modo de administración, y se puede determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación respectiva. Por ejemplo, en una realización, la dosis de inhibidor de FXII es 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg, o cualquier dosis intermedio, o desde 0,1-1000 mg/kg, o 1-1000 mg/kg, o 1-500 mg/kg, o 50-500 mg/kg, 50-200 mg/kg, o 100-200 mg/kg, o cualquier intervalo de dosis intermedio.

40 En las realizaciones que implican una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno, una dosis terapéuticamente eficaz es una dosis que provoca un efecto terapéutico positivo en el paciente o sujeto que requiere el tratamiento. Una dosis terapéuticamente eficaz generalmente está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 hasta 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 hasta 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 hasta 10 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 hasta 5 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 hasta 2 mg/kg o desde aproximadamente 0,1 hasta 1 mg/kg, o cualquier intervalo de dosis intermedio, o una de las dosis para un inhibidor de FXII presentado anteriormente o en los ejemplos.

45 El tratamiento puede comprender administrar una dosis única o dosis múltiples. Si se requieren dosis múltiples, se pueden administrar diariamente, cada dos días, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente o bimensualmente, o según se requiera. También se puede usar un depósito que libera lentamente y continuamente el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser una dosis que inhibe FXIIa en el sujeto al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, más preferentemente al menos 95 %, 99 % o incluso 100 % (o cualquier porcentaje intermedio).

55 El inhibidor de FXII se puede administrar solo o conjuntamente con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden co-formular, o se pueden administrar como formulaciones separadas, ya sea simultáneamente o por separado y mediante la misma vía de administración o vías de administración diferentes. El programa de administración o dosis de un inhibidor de FXII puede también variar entre pacientes individuales con la misma indicación o indicaciones diferentes dependiendo de factores tales como otras afecciones médicas o terapias.

Las realizaciones se ilustran además por los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar como limitantes. Otras realizaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de las realizaciones desveladas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: El sistema de coagulación de sangre plasmática como una innovadora diana en la esclerosis múltiple

Estudios preliminares sugieren que la hemostasis primaria y secundaria participan en la neurodegeneración inflamatoria en la EM. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente en el modelo animal de EAE que STIM1 y STIM2, que ya se habían identificado como moléculas clave en la activación de plaquetas dependiente de Ca^{2+} , representan importantes determinantes patofisiológicos de la reacción inflamatoria y neurodegeneración (Schuhmann et al., J. Immunol. 2010; 184:1536-42). Además, los depósitos de fibrinógeno y fibrina se encuentran en tanto los vasos centrales como el parénquima cerebral de pacientes con EM (Sobel & Mitchell, Am. J. Pathol. 1989; 135:161-68; Claudio et al., Acta Neuropathol 1995; 90:228-38; Marik et al., Brain 2007; 130:2800-15). La fibrina es el producto final del denominado sistema de coagulación de sangre plasmática, que a su vez está constituido de los sistemas extrínseco e intrínseco. El factor de coagulación XII (FXII) es el punto de partida de la cascada de coagulación de la sangre intrínseca, que inicialmente conduce a la activación de FXI. Al mismo tiempo, activa el sistema de contacto proinflamatorio (quinina), cuyo punto final es la formación de bradiquinina.

El trabajo de los presentes inventores demostró que el receptor de bradiquinina B1 R es un regulador importante de la invasión de células inflamatorias en un modelo de EAE (Göbel et al., J. Autoimmun 2011:36:106-14). Los ratones deficientes en B1 R experimentaron EAE menos grave. Similarmente, los ratones no mutantes tratados con un antagonista selectivo de B1 R también experimentaron un menor máximo de enfermedad en comparación con los ratones sin tratar. A diferencia, el bloqueo del receptor de bradiquinina B2R por alteración del gen *B2R* no alteró el transcurso de la enfermedad de EAE. De forma interesante, B2R media en la mayoría de los efectos de la bradiquinina, aunque tanto B1R como B2R median en el proceso inflamatorio clásico después de la lesión de tejido. Además, no está claro el mecanismo que conduce a la actividad de bradiquinina *in vivo*, puesto que la bradiquinina se puede activar por al menos dos vías: la vía de coagulación intrínseca y otra vía que debe ser FXII independiente puesto que ocurre incluso en ratones inactivados en FXII (Schmaier AH, Int. Immunopharmacol. 2008; 8:161-65.)

Para probar si FXII también contribuye o no a EAE, se indujo EAE por inmunización de ratones C57Bl/6 hembra de 10-12 semanas de edad, deficientes en FXII o FXI, con 200 µg de MOG₃₅₋₅₅. Se usa el modelo de ratón C57Bl/6 MOG₃₅₋₅₅ comúnmente usado para la validación preclínica de compuestos terapéuticos (Krishnamoorthy & Wekerle, Eur. J. Immunol 2009; 39:2031-35). El transcurso de la EAE en este modelo se parece a la forma progresiva primaria de EM, puesto que una vez inducida la enfermedad no remite. Se complementó adyuvante completo de Freund (CFA) con MOG para obtener una emulsión de 1 mg/ml y se inyectaron 2 x 100 µl por vía subcutánea en dos sitios diferentes del flanco de ratones profundamente anestesiados. Se inyectó toxina Pertussis el día de inmunización y 2 d después (400 ng, Alexis, San Diego, CA). Todos los animales se mantuvieron en condiciones normales y tuvieron acceso a agua y comida a voluntad.

También se realizó modulación farmacológica usando el antagonista de FXII H-D-Pro-Phe-Arg-clorometilcetona (PCK) (8 µg/g; Bachem) administrado por inyección intravenosa diaria. PCK inhibe irreversiblemente la actividad amidolítica de FXII activado (FXIIa) y la activación de FXII mediada por calicreína de plasma (Tans et al., Eur. J. Biochem. 1987; 164:637-42; Kleinschnitz, J Exp Med. 2006 Mar 20;203(3):513-8).

Se monitorizó la evolución clínica de EAE diariamente por dos investigadores desconocedores del tratamiento usando el siguiente sistema de puntuación: grado 0, ninguna anomalía; grado 1, punta de la cola flácida; grado 2, cola flácida; grado 3, debilidad moderada de las extremidades traseras; grado 4, debilidad completa de las extremidades traseras; grado 5, paraparesia leve; grado 6, paraparesia; grado 7, paraparesia fuerte o paraplejía; grado 8, tetraparesia; grado 9, cuadriplejía o estado premoribundo; grado 10, muerte. Se sacrificaron los animales con una puntuación superior a 7 y continuaron con la puntuación acorde hasta el final del experimento.

En ratones deficientes en FXII, se redujo significativamente la máxima tasa de enfermedad (Figura 4A). Se obtuvieron resultados similares en un bloqueo farmacológico con PCK (Figura 4C, 4D). PCK tuvo un efecto incluso cuando el tratamiento empezó en el día 12, cuando los animales ya mostraron síntomas de EAE (Figura 4D). Pero en ratones deficientes en FXI, la evolución de la enfermedad de EAE fue similar a aquella en los ratones de control no mutantes (Figura 4B). Puesto que FXI está inmediatamente aguas abajo de FXII y se activa por FXIIa, estos resultados indican que no es la función de FXII en la cascada de coagulación intrínseca la que condujo al efecto protector observado en el modelo de EAE.

Además de la reducción en la puntuación de enfermedad, el número de focos inflamatorios y tanto la desmielinización como el daño axonal también se redujeron significativamente en animales deficientes en FXII. La Figura 5 representa el número de focos inflamatorios (Fig. 5A), área/sección desmielinizada (Fig. 5B) y las cifras de axones (Fig. 5C) en ratones de control (barra izquierda), tratados con PCK (barra central) y FXII-/- (barra derecha). Para la cuantificación, se examinaron las secciones teñidas en un modo cegado por microscopía (Axiophot2, Zeiss; Oberkochen, Alemania) con una cámara CCD (Visitron Systems; Tuchheim, Alemania). Se contaron los focos inflamatorios (H&E), áreas desmielinizadas (LFB) y células en cinco muestras seleccionadas al azar utilizando el software MetVue (Molecular Devices; Downingtown, EE.UU.). El número de axones se analizó en lesiones definidas. La intensidad de fluorescencia se midió utilizando ImageJ (NIH, USA). Ejemplos de comparaciones histológicas

entre ratones de control (Con) y tratados con PCK se presentan para cada gráfico de barras. Las flechas muestran áreas de inflamación (Fig. 5A), desmielinización (Fig. 5B) y daño axonal (Fig. 5C).

Los análisis *in vitro* también mostraron una respuesta inmunitaria alterada (Fig. 5D y 5E). Se aislaron esplenocitos de ratones inmunizados en el máximo de enfermedad y 50 días después de la inducción de EAE y se estimularon con el péptido MOG₃₅₋₅₅ (10 mg/ml) o perlas CD3/CD28 (relación entre célula y perla 2:1). Para el ensayo de proliferación mostrado en la Fig. 5D, se cultivaron 1×10^5 esplenocitos en 1 ml de DMEM que contenía HEPES 10 mM, 25 mg/ml de gentamicina, mercaptoetanol 50 mM, 5 % de FCS, glutamina 2 mM y 1 % de aminoácidos no esenciales (Cambrex; Verviers, Bélgica) durante tres días y se estimuló con perlas CD3/CD28 (relación entre célula y perla 2:1; Dynal Biotech, Hamburgo, Alemania) o 10 mg/ml de MOG₃₅₋₅₅. Se añadió ³H-timidina (Amersham; Piscataway, NJ) durante las 14 horas finales, y se midió la radiactividad en un contador de beta-centelleo (TopCount NXT; PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Alemania). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

Como se muestra en la Fig. 5D, la proliferación entre los esplenocitos de ratones de control (barra izquierda), tratados con PCK (barra central) y FXII^{-/-} (barra derecha) estimulados con perlas CD3/CD28 no fue significativamente diferente. Cuando se usó el péptido MOG₃₅₋₅₅ para estimular la proliferación, hubo una diferencia significativa entre ratones de control y tratados con PCK, pero no entre ratones de control y FXII^{-/-}.

También se evaluaron los sobrenadantes de esplenocitos restimulados con MOG para niveles de proteína IFN γ , IL-17, IL-4 e IL-6 por ELISA (R&D Systems; Wiesbaden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Los resultados, presentados en la Fig. 5E, muestran que hubo producción reducida de IL-17, TNF α e IL-6 de esplenocitos de tanto los ratones tratados con PCK (barra central) como FXII^{-/-} (barra derecha) en comparación con control. Los niveles de IFN γ no fueron significativamente diferentes.

Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que la inhibición de FXII conduce a un cambio en la respuesta inmunitaria periférica que no está asociado con el cambio en la cascada de coagulación intrínseca.

Ejemplo 2: Un inhibidor de proteína de FXII también inhibe signos clínicos de enfermedad en un modelo progresivo primario de inflamación neurológica autoinmune

rHA-Infestina-4, otro inhibidor de FXII, también fue activo en el modelo de EAE descrito en detalle en el Ejemplo 1. En este estudio, los ratones se trataron con rHA-infestina-4, una proteína que comprende albúmina humana fusionada con el dominio de infestina 4 mediante un conector (que se describe en Hagedorn et al. Circulation 2010; 117:1153-60) por inyecciones intravenosas diarias a una dosis de 200 μ g/g.

Como se muestra en la Fig. 6A, rHA-infestina-4 también redujo la puntuación de EAE pronto en el transcurso de la enfermedad. Y como se observó en el estudio en ratones tratados con PCK y FXII^{-/-}, el tratamiento con rHA-infestina-4 produjo una reducción significativa en la producción de IL-17 con respecto al control (Fig. 6B).

Estos resultados proporcionan evidencia adicional de que el bloqueo farmacológico de FXII ofrece una nueva estrategia antiinflamatoria alternativa al tratamiento de EM.

Ejemplo 3: El tratamiento con el anticuerpo anti-FXII inhibe los signos clínicos de enfermedad en un modelo recidivante de inflamación neurológica autoinmune

También se usó un anticuerpo anti-factor XII para probar la función de FXII en un segundo modelo de EAE - ratones SJL hembra inmunizados con el péptido PLP (proteína de proteolípido de mielina). Este modelo de ratón de EAE replica muchos de los signos clínicos e histopatológicos de EM, que incluyen degeneración de la función de neuronas motoras. Al igual que el modelo C57Bl/6 MOG₃₅₋₅₅, los ratones SJL inmunizados con PLP es un modelo aceptado para su uso en la validación preclínica de compuestos terapéuticos. (Krishnamoorthy & Wekerle, Eur. J. Immunol 2009; 39:2031-35). El modelo de PLP de SJL, sin embargo, también experimenta remisión y recaída, como ocurre en la forma remitente recidivante de EM.

Se indujo EAE en ratones SJL hebra de edad 8-12 semanas inmunizándolos por vía subcutánea con 100 μ g de péptido PLP (139-151) (Mimotopes, Clayton, Vic, Australia) emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) (Difco, BD San Diego, CA, EE.UU.), seguido por 200 ng de toxina Pertussis (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) administrada por vía intravenosa en el día 0. En el día "-1" (es decir, el día antes de la inyección de inducción de EAE), y en los días 1, 3, 6, 8, 10, 13 y 15 tras la inducción, los animales de control se administraron con una inyección subcutánea de 200 μ g de anticuerpo monoclonal de control de isotipo, mientras que el grupo experimental recibió mAb anti-FXII (3F7). La enfermedad se monitorizó desde el día 0 hasta 15. Se evaluó la puntuación clínica como se describe en Langrish et al., J Exp Med. 2005; 201:233-40, con una puntuación máxima de 6 para cada ratón. Todos los procedimientos animales fueron autorizados por el comité ético de animales CSL.

El tratamiento de ratones con un anticuerpo neutralizante monoclonal anti-FXII (mAb) inhibió la progresión clínica de EAE en este modelo de recaída (Figura 7). La inhibición fue la más eficaz en la etapa temprana de la enfermedad.

Para evaluar el efecto del bloqueo de FXII sobre las respuestas inflamatorias de procitocina *in vivo*, se sangraron los animales en el día 9 y se recogió el suero para el análisis de citocinas por el ensayo Luminex (Millipore, Billerica,

MA, EE.UU.) en un instrumento Luminex 200 (Austin, TX, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El tratamiento con el anticuerpo anti-FXII condujo a una reducción en la liberación de citocinas proinflamatorias en la sangre. Como se muestra en la Figura 8, anti-FXII redujo los niveles de GM-CSF, IFN γ , TNF α e IL-1 β .

5 Los macrófagos y las células dendríticas (DC) son importantes en lesiones inflamatorias de EAE y EM y tienen funciones en mediar en la lesión de tejido. Contribuyen por producción de citocinas proinflamatorias, presentación de antígenos a linfocitos autorreactivos, y en la producción de especies reactivas de oxígeno que causan el daño directo de mielina (Graham et.al., 2009). Chemerin es una molécula que circula como un zimógeno dentro de la sangre, y se activa por serina proteasas que incluyen plasmina, elastasa de neutrófilo, y a un menor grado FVIIa. FXIIa, sin embargo, es el principal activador (Qu y Chaikof, 2010). Chemerin activado es un potente quimioatrayente para células que expresan el receptor 1 de tipo quimiocina (CMKLR1), también conocido como ChemR23. Este receptor se expresa altamente por células dendríticas plasmacitoides (pDC), macrófagos residentes en tejido, monocitos y células NK (Hart y Greaves, 2010). Los estudios por Graham et al. (2009) han mostrado que las inactivaciones en ratón del receptor de chemerin, CMKLR1, o Chem23, tienen puntuaciones clínicas globales más bajas en experimentos de EAE. Por consiguiente, es posible que, al menos en el modelo de EAE recidivante, el bloqueo de la acción de FXII con un anticuerpo pueda actuar, al menos en parte, reduciendo la cantidad de chemerin activa, produciendo así un efecto terapéutico en los experimentos de EAE.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CSL Behring GmbH et al
 <120> Inhibidores del factor XII para el tratamiento de trastornos inflamatorios neurológicos
 <130> A189
 <140> EP2012153341.8
 <141> 31-01-2012
 <160> 19
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Triatoma infestans
 <400> 1

Met Arg Tyr Leu Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ala Phe Ser Ala Val Ser
 1 5 10 15

Ala Glu Lys Lys Asp Pro Pro Cys Val Cys Pro Leu Ile Trp Lys Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Gly Gln Thr Tyr Pro Ser Glu Cys Ile Leu Asn
 35 40 45

Cys Val Lys Tyr Ala Leu Lys Lys Asp Ile Lys Val Ala Tyr Gln Gly
 50 55 60

Ile Cys Lys His Val Thr Phe Ala Ala Glu Glu Glu Gln Glu Val Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Lys Gly Pro Cys Glu Cys Pro Arg Ala Leu His Arg Val Cys
 85 90 95

Gly Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Ser Asn Pro Cys Thr Leu Asn Cys Ala
 100 105 110

Lys His Glu Arg Lys Ser Asp Leu Val Gln Val His Glu Gly Pro Cys
 115 120 125

Ser Pro Asp Glu His Glu Phe Glu Asp Pro Cys Glu Cys Asp Asn Lys
 130 135 140

Phe Asp Pro Val Cys Gly Thr Gly Glu Val Thr Tyr Arg Asn Leu Cys
 145 150 155 160

ES 2 687 018 T3

His Leu Glu Cys Ala Thr Phe Thr Thr Ser Pro Gly Val Glu Val Asp
 165 170 175

Tyr Glu Gly Glu Cys Leu Ala Glu Thr Val Leu Leu Glu Glu Asn His
 180 185 190

Cys Ala Cys Pro Arg Val Leu His Arg Val Cys Gly Ser Asp Gly Asn
 195 200 205

Thr Tyr Ser Asn Pro Cys Thr Leu Asp Cys Ala Lys His Glu Gly Lys
 210 215 220

Pro Asp Leu Val Gln Val His Glu Gly Pro Cys Asp Pro Asn Asp His
 225 230 235 240

Asp Phe Glu Asp Pro Cys Glu Cys Asp Asn Lys Phe Glu Pro Val Cys
 245 250 255

Gly Thr Asp His Ile Thr Tyr Ser Asn Leu Cys His Leu Glu Cys Ala
 260 265 270

Ala Phe Thr Thr Ser Pro Gly Val Glu Val Lys Tyr Glu Gly Glu Cys
 275 280 285

His Ala Glu Ile Met Glu Gln His Gln Ile Leu Lys Ser Cys Ile Cys
 290 295 300

Thr Lys Met Tyr Lys Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly His Thr Tyr Pro
 305 310 315 320

Asn Leu Cys Val Leu Lys Cys Arg Ile Ser Ser Lys Pro Gly Leu Lys
 325 330 335

Leu Ala His Val Gly Lys Cys Gly Ile Gly Leu Leu Ala Val Glu Thr
 340 345 350

Lys Glu Val Arg Asn Pro Cys Ala Cys Phe Arg Asn Tyr Val Pro Val
 355 360 365

Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Gly Asn Pro Cys Met Leu Asn Cys
 370 375 380

Ala Ala Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Lys Leu Val His Lys Gly Arg
 385 390 395 400

Cys Gln Arg Ser Asp Val Glu Gln Phe
 405

ES 2 687 018 T3

<210> 2
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Triatoma infestans

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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> 4
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<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 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

<210> 5
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Lys Glu Gly Pro Cys
 50

<210> 6
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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> 7
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

ES 2 687 018 T3

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

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

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

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

Ala Arg Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu
85 90 95

Arg Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Tyr Ile Met Gln
 1 5

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Ile Arg Pro Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR2 de la cadena pesada que muestra variaciones

<220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa se selecciona de Arg, Asn y Asp

<220>
 <221> variante
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa se selecciona de Pro, Val, Ile y Met

<220>
 <221> variante
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa se selecciona de Ser, Pro y Ala

<220>
 <221> variante
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de Gly, Leu, Val y Thr

<220>
 <221> variante
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa se selecciona de Gly, Tyr, Gln, Lys, Arg, Asn y Met

<220>
 <221> variante

<222> (8)..(8)
 <223> Xaa se selecciona de Thr, Gly y Ser

<400> 11

Gly Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Ile Ser Pro His Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15

Ala Leu Asp Val
 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR3 de la cadena pesada que muestra variaciones

<220>
 <221> variante
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa se selecciona de Ala, Met y Val

<220>
 <221> variante
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa se selecciona de Ser y Lys

<220>
 <221> variante
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa se selecciona de Pro, Lys, Thr e His

<220>
 <221> variante
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa se selecciona de His, Asn, Gly y Gln

<400> 13

Ala Leu Pro Arg Ser Gly Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15

Ala Leu Asp Val
20

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 15

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Ala Trp Asp Ala Ser Leu Arg Gly Val
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> variante
<222> (2)..(2)
<223> Xaa se selecciona de Ala y Ser

<220>
<221> variante
<222> (4)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> variante
<222> (7)..(7)
<223> Xaa se selecciona de Leu y Val

<220>
<221> variante
<222> (9)..(10)

ES 2 687 018 T3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 17

Ala	Xaa	Trp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Xaa
1			5					10	

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser	Gly	Ser	Ser	Glu	Met	Thr	Val	His	His	Tyr	Val	Tyr
1				5					10			

<210> 19

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 687 018 T3

145		150		155		160									
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	Lys	Gln	Leu	Gly	Glu
385					390					395					400

ES 2 687 018 T3

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

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

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de factor XII para su uso en la prevención y/o el tratamiento y/o la mejora de una enfermedad inflamatoria neurológica,

en el que el inhibidor de FXII comprende

5 (i) la secuencia de polipéptidos de infestina-4 no mutante (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma, en la que la variante comprende

(a) los aminoácidos 2-13 del extremo N de SEQ ID NO: 2; y al menos una y hasta cinco mutaciones de aminoácido fuera de dichos aminoácidos de extremo N que dan como resultado diferencias de la secuencia de infestina-4 no mutante;

10 y/o

(b) seis restos de cisteína conservados; y homología de al menos 70 % con la secuencia de infestina-4 no mutante;

o

15 (ii) un anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une a FXII e inhibe su actividad y/o activación.

2. Inhibidor de factor XII para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende (a) una región VH que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 9, la CDR2 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 11 y la CDR3 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 13; y/o (b) una región VL que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 15 y la CDR3 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 17.

3. Inhibidor de factor XII para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende (a) una región VH que comprende la CDR1 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 9, la CDR2 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 10 y la CDR3 de la cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 12; y/o (b) una región VL que comprende la CDR1 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 15 y la CDR3 de la cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 16.

4. Inhibidor de factor XII para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo anti-FXII o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región VH que comprende SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 8.

5. Inhibidor de factor XII para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo anti-FXII es una IgG.

6. Inhibidor de factor XII para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el inhibidor de FXII se asocia con un polipéptido potenciador de la semivida que es albúmina, afamina, alfa-fetoproteína, proteína de unión de vitamina D, albúmina humana o una variante de las mismas, una inmunoglobulina o una variante de la misma, PEG o una variante del mismo, o un Fc de una IgG.

7. Inhibidor de factor XII para su uso según la reivindicación 6, en el que el polipéptido que potencia la semivida se asocia con el inhibidor de FXII mediante un conector.

8. Inhibidor de factor XII para su uso según la reivindicación 7, en el que el conector es

(a) escindible;

(b) escindible por una proteasa de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, extrínseca o común;

y/o

(c) escindible por el factor XIIa.

9. Inhibidor de factor XII para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el inhibidor de FXII es una proteína de fusión de albúmina humana-conector-FXII.

10. Inhibidor de factor XII para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la enfermedad inflamatoria neurológica es esclerosis múltiple, mielitis transversa o neuromielitis óptica (enfermedad de Devic).

11. Inhibidor de factor XII para su uso según la reivindicación 10, en el que la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple remitente recidivante o esclerosis múltiple progresiva primaria.

Fig. 1

```

MRYLLLLGLA AFSAVSAEKK DPPCVCPLIW KPVCGSDGQT YPSECILNCV KYALKKDIKV
AYQGICKHVT FAAAAEQEVE GWKGPCECPR ALHRVCGSDG NTYNSPCTLN CAKHERKSDL
VQVHEGPCSP DEHEFEDPCE CDNKFDPCVG TGEVTYRNLC HLECATFTTS PGVEVDYEGE
CLAETVLLEE NHCACPRVLH RVCGSDGNTY SNPCTLDCAK HEGKPDVQV HEGPCDPNDH
DFEDPCECDN KFEPVCGTDH ITYSNLCHLE CAAFTTSPGV EVKYEGECHA EIMEQHQILK
SCICTKMYKP VCGTDGHTYP NLCVLKCRIS SKPGLKLAHV GKCGIGLLAV ETKEVRNPCA
CFRNYVPVCG SDGKTYGNPC MLNCAAQTKV PGLKLVHKGR CQRSDVEQF

```

SEQ ID NO: 1

Fig. 2

```

I 4      EVRNPC-----ACFRNYVPVCGSDGKTYGNPCMLNCAAQTKVPGLKLV-HEGRC
SP: DSLGREAK--CYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQKSGPC
      * | *          * | * *****|** ** * *|* * | *          * | * *
K1: DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYPNECVL-CFENRKRQTSILIQKSGPC
      *****          *****|** ** * *|* * | *          * | * *
K2: DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECML-CAENRKRQTSILIQKEGPC
      *****          *****|** ** * *|* * | *          * | * *
K3: DSLGREVRNPC-----ACFRNYVPVCGTDGNTYGNECMLNCAENRKRQTSILIQKEGPC
      *****          *****|** ** * *|* * | *          * | * *
  
```

Fig. 3

DAHKSEVAHR	FKDLGEENFK	ALVLIAFAQY	LQQCPFEDHV	KLVNEVTEFA
KTCVADESAE	NCDKSLHTLF	GDKLCTVATL	RETYGEMADC	CAKQEPERNE
CFLQHKDDNP	NLPRLVRPEV	DVMCTAFHDN	EETFLKKYLY	EIARRHPYFY
APELLFFAKR	YKAAFTECCQ	AADKAACLLP	KLDELRLDEGK	ASSAKQRLKC
ASLQKFGERA	FKAWAVARLS	QRFPKAEFAE	VSKLVTDLTK	VHTECCHGDL
LECADDRADL	AKYICENQDS	ISSKLKECCE	KPLLEKSHCI	AEVENDEMPA
DLPSLAADFV	ESKDVCKNYA	EAKDVFLGMF	LYEYARRHPD	YSVVLLLRRLA
KTYETTLEKC	CAAADPHECY	AKVFDEFKPL	VEEPQNLIKQ	NCELFKQLGE
YKFQNALLVR	YTKKVPQVST	PTLVEVSRNL	GKVGSKCCKH	PEAKRMPCAE
DYLSVVLNQL	CVLHEKTPVS	DRVTKCCTES	LVNRRPCFSA	LEVDETYVPK
EFNAETFTFH	ADICTLSEKE	RQIKKQTALV	ELVKHKPKAT	KEQLKAVMDD
FAAFVEKCCK	ADDKETCFAE	EGKKLVAASQ	AALGL	

SEQ ID NO: 19

Fig. 4

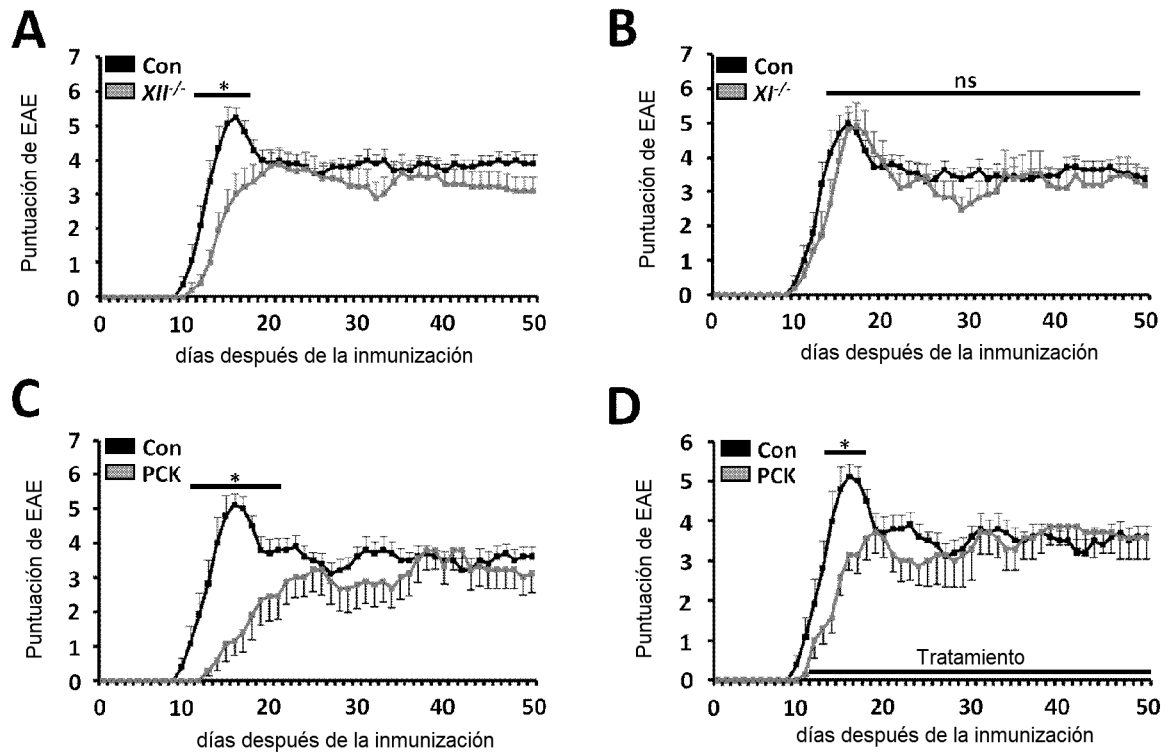
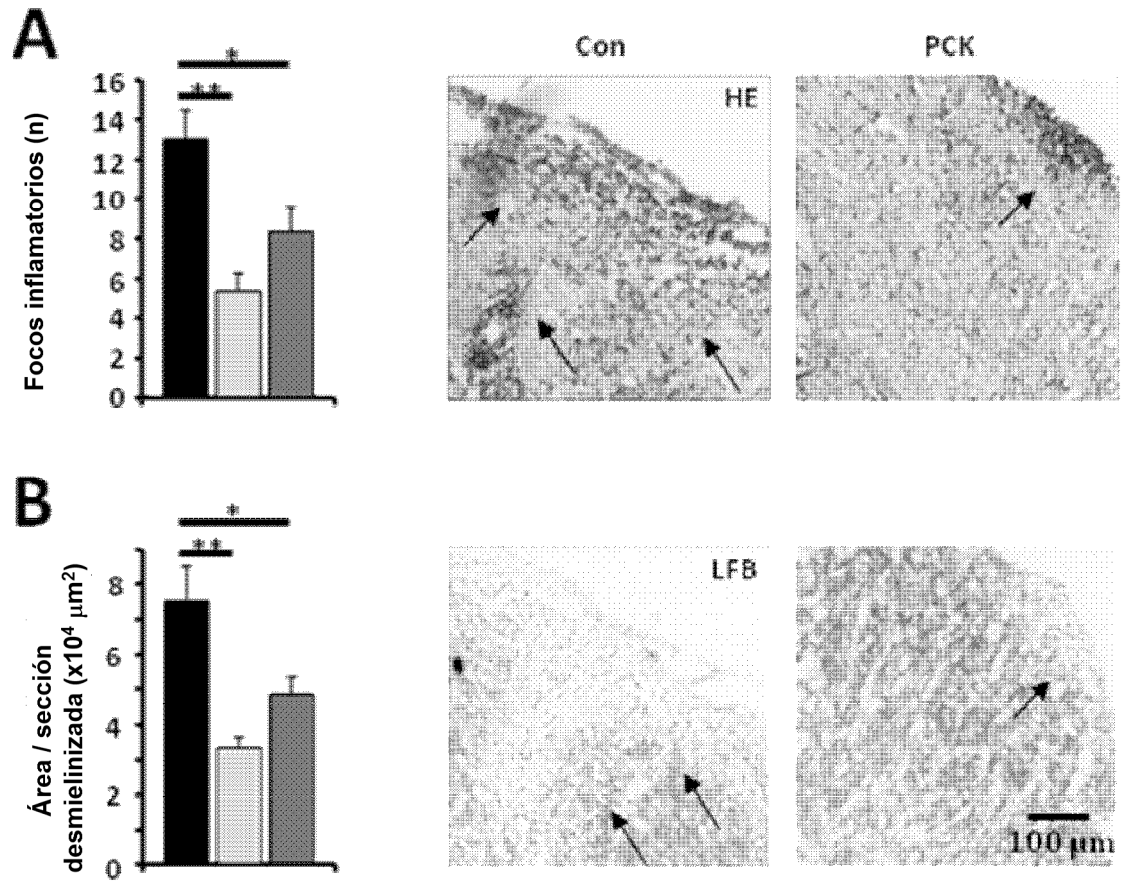


Fig. 5



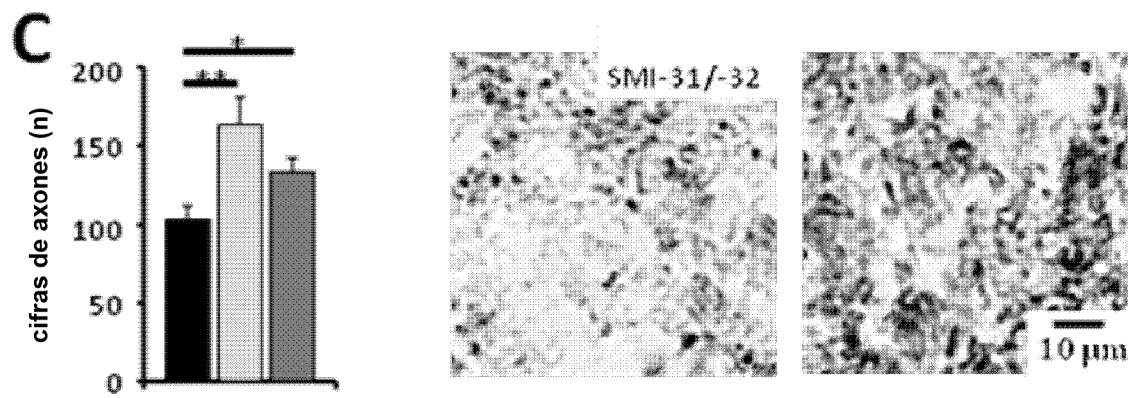


Fig. 5

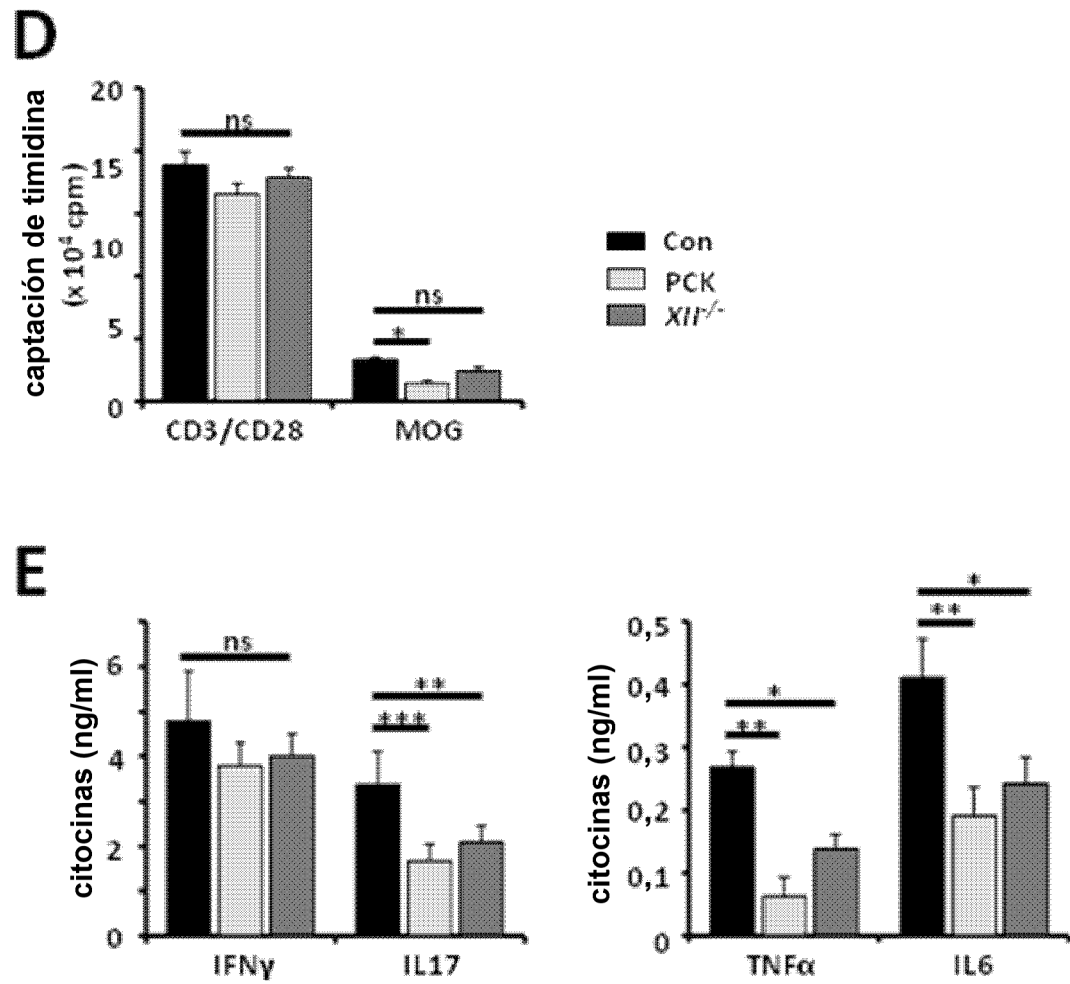


Fig. 6

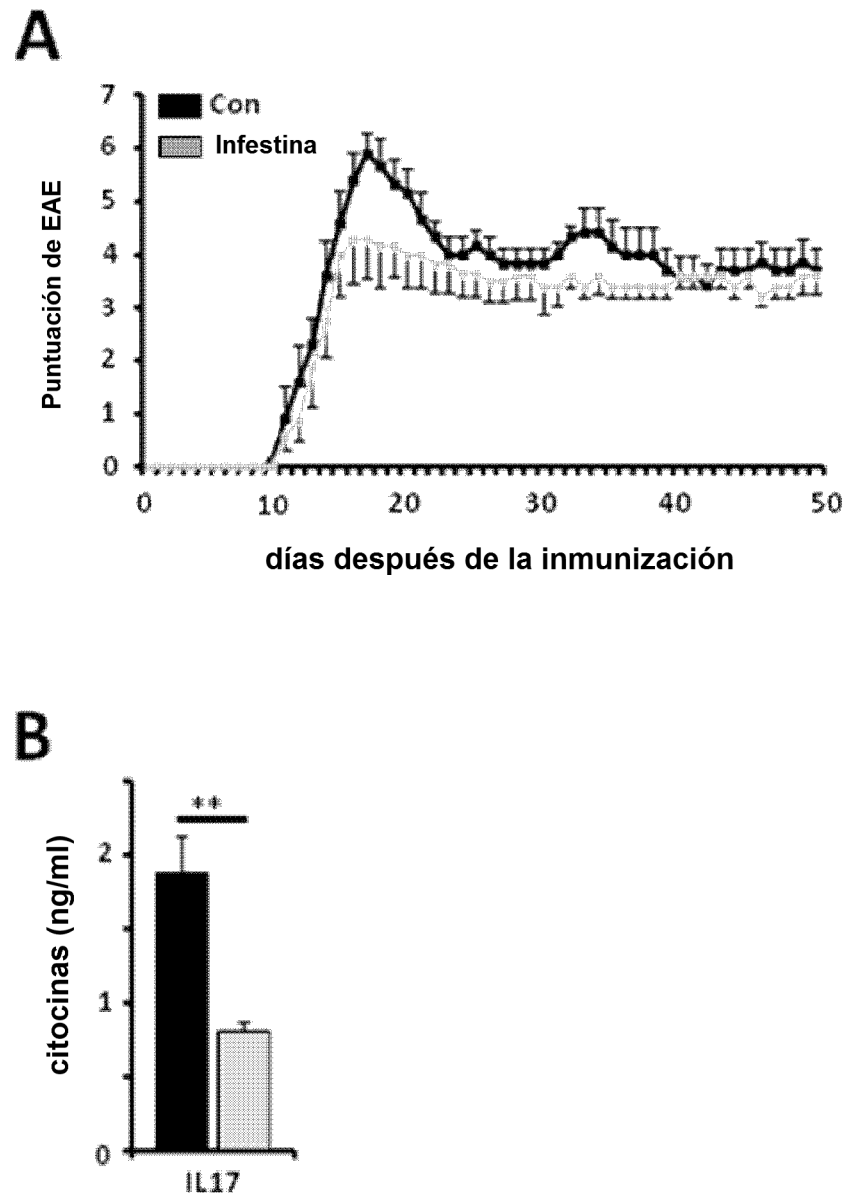


Fig. 7

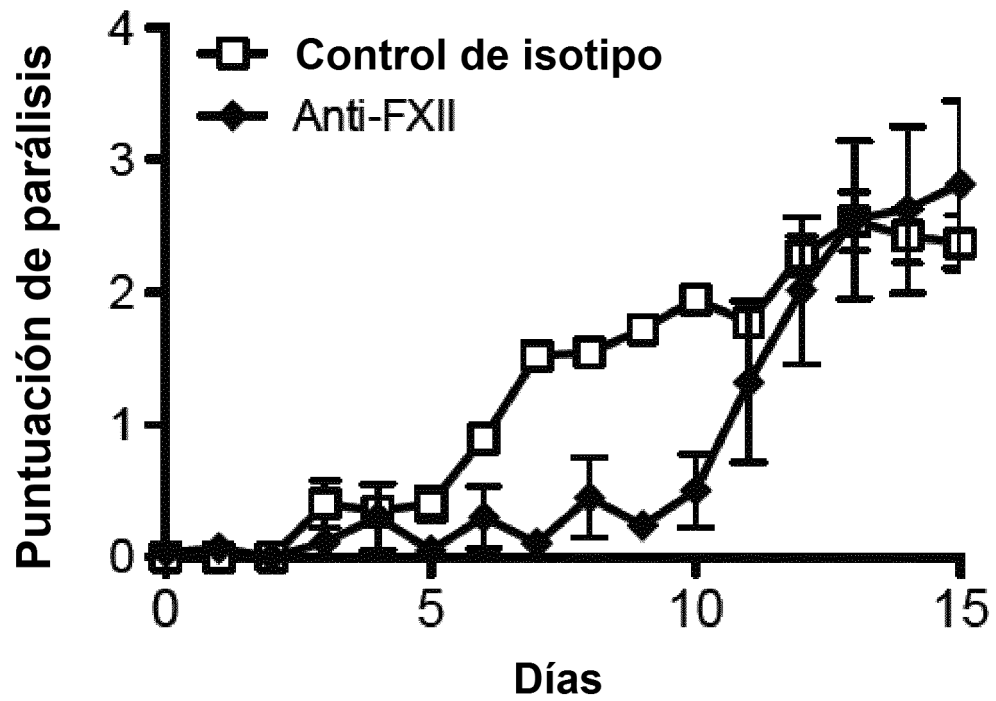


Fig. 8