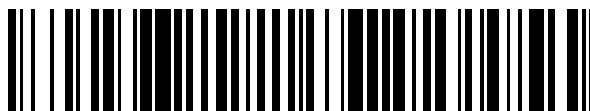


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 365**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2009 PCT/NL2009/050361**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09154461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2009 E 09766879 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2297207**

54 Título: **Uso de anticuerpos antifactor XI para la prevención o el tratamiento de la formación de trombos**

30 Prioridad:

19.06.2008 US 73882 P

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

28.02.2019

73 Titular/es:

**PROTHIX BV (100.0%)
Warmonderweg 23
2334 AB Leiden, NL**

72 Inventor/es:

HACK, ERIK

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 702 365 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

Uso de anticuerpos antifactor XI para la prevención o el tratamiento de la formación de trombos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se encuentra en el campo de la hematología, en particular en el campo de la coagulación. La invención se refiere a métodos para inhibir la formación de coágulos sanguíneos utilizando moléculas de unión que se unen específicamente e inhiben la activación y/o actividad del factor XI. La molécula de unión a antígeno se usa preferiblemente en métodos para reducir o prevenir la formación de trombos en injertos sintéticos, placas ateroscleróticas o en otros procesos patológicos trombóticos y tromboembólicos.

Antecedentes de la invención

15 [0002] La coagulación consiste en una respuesta humoral y celular. El primero conduce a la conversión de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, el segundo consiste en la activación de plaquetas que conducen a un tapón de plaquetas. Los tapones de plaquetas, los hilos de fibrina y los glóbulos rojos incluidos juntos constituyen un coágulo sanguíneo. Una molécula clave en la formación de coágulos es la trombina. Esta proteasa convierte el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, activa las plaquetas y convierte una serie de otros factores, incluidos los factores XI, VIII y V, en especies activas.

25 [0003] La trombosis patológica se refiere a la formación de coágulos que no forman parte de un proceso hemostático normal y que pueden provocar síntomas de enfermedades. Por ejemplo, la trombosis en una placa aterosclerótica en una arteria coronaria puede provocar un infarto agudo de miocardio y puede considerarse un tipo de trombosis patológica. La trombosis venosa profunda y la trombosis en injertos vasculares son otros ejemplos de trombosis patológica.

30 [0004] Los fármacos anticoagulantes actuales inhiben la vía basal de la coagulación: la heparina (a través de la antitrombina III) afecta a la trombina, factores Xa y IXa, las cumarinas inhiben la síntesis de protrombina, factores VII, IX y X, mientras que la heparina LMW principalmente inhibe el factor Xa. La ventana terapéutica de estos fármacos es estrecha y requiere una monitorización cuidadosa de los pacientes. Algunos de los medicamentos anticoagulantes más nuevos en fase de desarrollo tienen como objetivo el bucle de amplificación de FVIII/FIX.

35 [0005] Teniendo en cuenta la tendencia a la hemorragia grave que resulta de una deficiencia completa de los factores VIII o IX, en la hemofilia A o B, respectivamente, tomar como objetivo este nivel probablemente también requerirá una monitorización cuidadosa para prevenir el riesgo de efectos secundarios de sangrado, especialmente durante una sobredosis.

40 [0006] El factor XI no es un objetivo para los anticoagulantes actuales. Esto se debe principalmente al hecho de que la deficiencia del factor XI, en contraste con una deficiencia de los factores VIII o IX, no da lugar a una tendencia al sangrado grave. De hecho, muchas personas con deficiencia de factor XI nunca experimentan un episodio de sangrado grave. Solo dos estudios se han realizado con anticuerpos, en ambos casos policlonales, contra el factor XI que inhiben la función del factor XI in vivo, ya sea inhibiendo la actividad de la molécula o impidiendo su activación. En un primer estudio (Minnema et al., 1998, J Clin Invest. 101: 10-14) se utilizaron anticuerpos policlonales contra el factor XI de conejo para evaluar el efecto del bloqueo del factor XI sobre la formación de coágulos in vivo en un modelo experimental de trombosis en conejos. La incorporación de anticuerpos antifactor XI en los trombos de la vena yugular dio lugar casi a un aumento del doble en la trombólisis endógena en comparación con un anticuerpo de control. Se observó un efecto similar cuando el anticuerpo antifactor XI se administró sistémicamente.

50 [0007] El efecto de la administración de anticuerpos antifactor XI policlonales neutralizantes de cabra sobre la acumulación de plaquetas y fibrina en injertos arteriovenosos en babuinos fue tema de otro estudio para evaluar el factor XI como objetivo para la terapia antitrombótica (Gruber y Hanson, 2003, Blood 102: 953-955). En ese estudio se investigó el papel de la propagación del trombo dependiente del factor XI en condiciones de flujo arterial. Bajo las condiciones utilizadas, se produjo un rápido crecimiento del trombo en los injertos de dacrón o teflón desplegados en derivaciones arteriovenosas en babuinos tratados con anticuerpo antifactor XI humano. La administración de los anticuerpos policlonales contra el factor XI redujo notablemente el crecimiento del trombo intraluminal en ambas superficies. Se encontró que el efecto antitrombótico de los anticuerpos policlonales contra el factor XI era comparable con el de la heparina a dosis que prolongaron significativamente el tiempo parcial de tromboplastina, el tiempo de protrombina y el tiempo de sangrado, mientras que los anticuerpos anti-FXI solo afectaron al tiempo parcial de tromboplastina pero no al tiempo de protrombina y al tiempo de sangrado.

65 [0008] Sinha et al. (1985, J. Biol. Chem. 260: 10714-10719) describen un anticuerpo monoclonal 5F4 contra la cadena ligera de FXI, cuyo anticuerpo inhibe tanto la actividad de coagulación como la activación de FIX. Sin embargo, como muestran Akiyama et al. (1986, J. Clin. Invest. 78: 1631-1637), dicho anticuerpo 5F4 no inhibe la actividad FXI en el ensayo cromogénico S-2366.

[0009] Yamashita et al., (2006, J. Thromb. Haemost. 4: 1496-1501) describen un anticuerpo monoclonal designado XI-5108, cuyo anticuerpo es específico para la cadena ligera de FXI e inhibe la activación de FXa y FXIa inducida por FXIa. Sin embargo, el anticuerpo XI-5108 no inhibe la actividad FXIa en el sustrato cromogénico S-2366.

[0010] Sin embargo, todavía existe una necesidad en la técnica de terapias anticoagulantes basadas en moléculas de unión a antígeno que tomen como objetivo el factor XI.

10 Descripción de la invención.

[0011] La presente invención se refiere a medios y métodos para terapia anticoagulante que se basan en la inhibición del factor XI. Los inventores han encontrado que el factor XI es un objetivo preferido para la inhibición, ya que deja intactos la coagulación a través de la vía «basal» y el bucle de amplificación de FIX/VIII, lo que es suficiente para la mayoría de las condiciones hemostáticas. En otras palabras, los inhibidores del factor XI tienen menos riesgo de sufrir efectos secundarios de sangrado. De hecho, la deficiencia o la inhibición del factor XI no tuvieron efecto en el tiempo de sangrado, en contraste con la dosis alta de heparina que prolongó el tiempo de sangrado. Estos datos hacen del factor XI un objetivo atractivo para la terapia anticoagulante, más aún desde que, p. ej., las complicaciones hemorrágicas graves, tales como la hemorragia intracerebral, rara vez ocurren en personas con deficiencia de factor XI (F Peyvandi et al., Haematologica 2002; 87: 512-514). Por lo tanto, debido a su papel activo en la trombosis patológica y un papel menor en la hemostasia normal, el factor XI es un objetivo atractivo para la terapia anticoagulante.

[0012] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de unión que se une específicamente al factor XI, para usar en la prevención o el tratamiento de una trombosis patológica o en la prevención de la trombosis en un sujeto que tiene un riesgo mayor de desarrollar trombosis debido a un procedimiento médico, en donde la molécula de unión se une al sitio activo ubicado en la región de la cadena ligera del factor XI e inhibe la actividad del factor XIa en el ensayo cromogénico para determinar la actividad del factor XIa en donde se usa L-piroglutamil-L-prolil-L-arginina-p-nitroanilida como sustrato cromogénico y en el que la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión al factor XI. El factor XI se entiende en este documento como el factor XI de coagulación de plasma de mamíferos. En una realización preferida, una molécula de unión de la invención se une específicamente e inhibe la actividad funcional de al menos el factor XI humano. El factor de coagulación del plasma XI es una glucoproteína presente en el plasma humano a una concentración de 25-30 nM como un zimógeno que, cuando se convierte por proteólisis limitada en una serina proteasa activa, participa en la fase de contacto de la coagulación sanguínea. La secuencia del gen del factor XI humano se ha identificado y la secuencia de aminoácidos deducida se describe en la SEC ID N.º: 1. El gen del factor XI humano tiene una longitud de 23 kilobases (kb) y consta de 15 exones (I-XV) y 14 intrones. El exón I codifica la región 5' sin traducir, y el exón II codifica un péptido señal. Los siguientes ocho exones (III-X) codifican cuatro secuencias de repetición en tándem de 90 o 91 aminoácidos (dominios manzana) que están presentes en la región amino-terminal de la proteína madura. La región carboxilo-terminal de la proteína, que contiene el dominio catalítico de la serina proteasa, está codificada por cinco exones (XI-XV) que están interrumpidos por cuatro intrones. El factor XI es un zimógeno, que es único entre los otros factores de coagulación, ya que existe como un homodímero que consta de dos subunidades idénticas de 80 kDa conectadas por un solo enlace disulfuro. La conversión del factor XI de zimógeno a la forma activa, factor XIa, se logra mediante una única escisión en Arg₃₆₉-Ile₃₇₀ (SEC ID N.º: 1), sobre la cual la división de cada subunidad se convierte en una cadena ligera de 35 kDa y una cadena pesada de 50 kDa unidas por enlaces disulfuro. La cadena ligera contiene un sitio catalítico. Cada cadena pesada está compuesta por cuatro repeticiones de 90-91 aminoácidos llamados dominios manzana (A1-A4) con A1 ubicado en el extremo aminoterminal de la cadena pesada. Así, el factor XI completamente activado consta de dos cadenas ligeras de 35 kDa y dos cadenas pesadas de 50 kDa, y contiene dos sitios activos. El dominio A1 contiene el sitio de unión para el cininógeno de alto peso molecular y la trombina. La función del dominio A2 no está clara, inicialmente se informó de que contenía un sitio de interacción con el factor IX, pero más adelante se demostró que este sitio estaba ubicado en el dominio A3. El dominio A3 también contiene un sitio de unión para heparina y plaquetas. Los sitios de unión para el factor IX y las plaquetas están cerca uno del otro y Gailani et al. (D Gailani et al., Blood 2001; 97: 3117-3122) han postulado que esta es la razón de la estructura dimérica: debido a su estructura dimérica, el factor XI puede unirse a través del dominio A3 de una subunidad a las plaquetas y usar su otro dominio A3 para interactuar con el factor IX. De esta manera, el factor XI puede dirigir la activación de la coagulación a la superficie plaquetaria. Finalmente, el dominio A4 del factor XI está involucrado en la formación de dímeros, contiene una cisteína libre de importancia desconocida y un sitio de interacción con el factor XIIa. El factor XI puede ser activado por al menos tres proteasas de coagulación, factor XIIa, factor XIa (autoactivación) y trombina.

[0013] Se puede decir que una molécula de unión de la invención, que puede unirse a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por una molécula diana del factor XI (o un epítipo en la molécula diana del factor XI) está «en contra» o «dirigida contra» dicha molécula diana o antígeno. El término «especificidad» se refiere al número de diferentes tipos de epítipos o dianas antigénicas en el factor XI al que se puede unir una molécula de unión (a antígeno) particular. La especificidad de una molécula de unión a antígeno puede determinarse en función de la

afinidad y/o la avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (K_D), es una medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno. Alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$. La afinidad se puede determinar de una manera conocida per se, dependiendo de la combinación específica de proteína de unión a antígeno y el antígeno de interés.

[0014] La avidéz se entiende en este documento como la fuerza de unión de una molécula diana con múltiples sitios de unión por un complejo más grande de agentes de unión, es decir, la fuerza de unión de la unión multivalente. La avidéz se relaciona tanto con la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno como con el número de sitios de unión presentes en la molécula de unión a antígeno. La afinidad, por otro lado, se refiere a sistemas de ligandos de receptores monovalentes simples.

[0015] Típicamente, las moléculas de unión al factor XI de la invención se unirán a la molécula diana con una constante de disociación (K_D) de unos 10^{-7} a 10^{-12} M o menos, y preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} M o menos, y/o con una afinidad de enlace de al menos 10^7 M, preferiblemente de al menos 10^8 M, más preferiblemente de al menos 10^9 M, tal como de al menos 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} M o más. Se considera que cualquier valor K_D mayor que 10^{-4} M (es decir, menos de 100 μ M) generalmente indica una unión no específica. Preferiblemente, una molécula de unión de la invención se unirá al factor XI con una afinidad menor de 50, 10 o 5 nM, más preferiblemente de menos de 1 nM, como, por ejemplo, menos de 500, 200, 100, 50, 10 o 5 pM. La unión específica de una molécula de unión al factor XI se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida per se, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitivos, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos competitivos tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas per se en la técnica.

[0016] Las moléculas de unión de la invención inhiben al menos una de las actividades funcionales del factor XI y la activación del factor XI. Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención inhiben la actividad funcional del factor XI y/o inhiben la activación del factor XI, independientemente de cómo se active el factor XI. Una molécula de unión de la invención, es decir, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tiene preferiblemente un solo sitio de unión que se une al factor XI e inhibe su activación o su actividad.

[0017] En una realización preferida, la molécula de unión inhibe la actividad del factor XI al unirse al sitio activo ubicado en la región de la cadena ligera de la molécula.

[0018] En otra realización preferida, la molécula de unión se une preferentemente a la forma activada del factor XI e inhibe la actividad del factor XI mediante la unión al sitio activo ubicado en la región de la cadena ligera de la molécula.

[0019] Las moléculas de unión de la presente invención se caracterizan así por su capacidad para evitar la activación y/o inhibir la actividad del factor XI y/o para inhibir la activación del factor IX. Dichos inhibidores pueden seleccionarse mediante la evaluación de su efecto en diversos ensayos tal como se describe en los ejemplos de este documento. En particular, las moléculas de unión al factor XI pueden seleccionarse mediante la evaluación de su efecto sobre la actividad coagulante del sistema de coagulación según se determina con un tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT) en plasma humano. Las propiedades funcionales de las moléculas de unión al factor XI de la invención se pueden probar agregándolas a plasma humano fresco, seguido de la medición del APTT en un ensayo de coagulación normal. En caso de un anticuerpo inhibidor, se observará una prolongación del APTT. Como controles, se examinan el plasma normal (APTT normal) y el plasma deficiente en factor XI (APTT prolongado). Estos ensayos de coagulación son bien conocidos en la técnica (ver también los ejemplos en este documento).

[0020] Los efectos de las moléculas de unión al factor XI en la función de la molécula de factor XI también pueden examinarse utilizando sustratos cromogénicos. Los sustratos cromogénicos consisten en pequeños péptidos acoplados a p-nitroanilida (pNA). La hidrólisis del sustrato libera pNA que se puede medir con un espectrofotómetro. La especificidad del sustrato para ciertas proteasas depende de la secuencia precisa del péptido enlazado a la pNA. En el caso del factor XIa, es apropiado el sustrato S2366 (Pyr-Glu-Pro-Arg-pNA-2H₂O; Chromogenix, Molndal, Suecia). La medición de la actividad del factor XIa con este sustrato se puede hacer usando el método descrito por Minnema et al. (1998, Blood 92: 3294-3301). Las moléculas de unión al factor XI que inhiben el centro catalítico del factor XIa pueden identificarse por su efecto inhibidor sobre la actividad cromogénica del factor XIa en dicha actividad cromogénica.

[0021] En un método alternativo, el factor XIIa purificado se puede usar para activar el factor XI, que luego se puede monitorizar midiendo su actividad cromogénica.

[0022] Las moléculas de unión al factor XI que inhiben la activación del factor XI por el factor XIIa se manifestarán disminuyendo la cantidad de factor XIa generado en este sistema.

- 5 [0023] En una realización, una molécula de unión al factor XI de la invención que inhibe la actividad funcional o la activación del factor XI es preferiblemente una molécula que produce al menos un 90 % de inhibición de la actividad del factor XI a una concentración de aproximadamente 50-80 nM en un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT). Más preferiblemente, la molécula produce al menos un 95 % de inhibición de la actividad del factor XI a una concentración de aproximadamente 50-80 nM en un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT). Más preferiblemente, la molécula produce al menos un 99% de inhibición de la actividad del factor XI a una concentración de aproximadamente 50-80 nM en un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT).
- 10 [0024] En una realización adicional, una molécula de unión al factor XI de la invención que inhibe la actividad funcional o la activación del factor XI es una molécula que produce al menos un 90 % de inhibición de la actividad del factor XI a una concentración de aproximadamente 20-50 nM en un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT). Más preferiblemente, la molécula produce al menos un 95 % de inhibición de la actividad del factor XI a una concentración de aproximadamente 20-50 nM en un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT). Más preferiblemente, la molécula produce al menos un 99% de inhibición de la actividad del factor XI a una concentración de aproximadamente 20-50 nM en un ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT).
- 15 [0025] El término «activador», tal como se usa en la invención, se refiere a «una molécula capaz de activar el factor XI de tal manera que este activa posteriormente el factor IX, que en presencia de su cofactor FVIII a su vez activa el factor X y el resto de la cascada de coagulación». Las moléculas activadoras incluyen trombina, factor XIIa y factor XIa.
- 20 [0026] Una molécula de unión al factor XI de la invención es un anticuerpo o un fragmento de unión al factor XI de un anticuerpo. Tal como se usa en el este documento, el término «molécula de unión» abarca así, entre otros, un anticuerpo y fragmentos del mismo, un unicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetravalente u otro anticuerpo multivalente que se une específicamente al factor XI e inhibe la actividad funcional de factor XI. El término «anticuerpo» se refiere a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos que se derivan de una biblioteca de fagos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, proteínas de unión a antígeno de dominio único y fragmentos de anticuerpos tales como, entre otros, de cadena sencilla de Fv.
- 25 [0027] También los anticuerpos producidos en otras especies animales, tales como anticuerpos de camélidos o fragmentos de los mismos («nanoanticuerpos») entran dentro del alcance de esta solicitud. Además, las moléculas con propiedades de unión similares a los anticuerpos, como las proteínas de repetición diseñadas, por ejemplo, las proteínas DARPins (proteínas de repetición diseñadas de la anquirina) están dentro del alcance de esta aplicación.
- 30 [0028] La molécula de unión al factor XI de la invención es un componente que se une específicamente a la molécula diana con una afinidad de unión deseada (como se define en este documento). La proteína de unión al factor XI de la invención es preferiblemente una proteína de unión a antígeno monoespecífica. Una composición que comprende una proteína de unión a antígeno monoespecífica se entiende que significa una composición que tiene una población homogénea de la proteína de unión al factor XI. Se deduce que la proteína monoespecífica de unión al factor XI es específica para un solo epítipo en un monómero de factor XI. Sin embargo, se incluye expresamente en la invención que las composiciones de la invención pueden comprender más de un tipo de proteína monoespecífica de unión al factor XI, cada una de las cuales se compone de una población homogénea. Normalmente, sin embargo, en el contexto de la presente invención, una composición de la invención no comprenderá más de 4, 6, 8, 10 o 20 proteínas monoespecíficas de unión al factor XI diferentes. La proteína de unión al factor XI es un anticuerpo o fragmento del mismo, en cuyo caso la proteína monoespecífica de unión al factor XI será un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, que puede obtenerse de una línea celular clonada (por ejemplo, un hibridoma) o expresarse a partir de una secuencia de codificación clonada. Por lo tanto, no se pretende que el término «anticuerpo monoclonal» esté limitado por la forma en que se realiza. El término proteína monoespecífica de unión al factor XI tal como se usa en este documento excluye, por lo tanto, anticuerpos policlonales y antisueros.
- 35 [0029] Además, cualquier constructo de un anticuerpo o de un fragmento también es un sujeto de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término «constructo» se refiere a diacuerpos, triacuerpos, anticuerpos tetravalentes, pepta o hexacuerpos, y similares, que se derivan de un anticuerpo antifactor XI humano según la presente invención. Dichos anticuerpos multivalentes que comprenden al menos un dominio hipervariable de un anticuerpo antifactor XI según la presente invención pueden ser mono, bi o multiespecíficos. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo preferido tiene un solo sitio de unión que se une al factor XI e inhibe su activación o su actividad.
- 40 [0030] Tal como se usa en el presente documento, el término «anticuerpo humano», pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o dirigida in vitro o por mutación somática in vivo.

5 [0031] Tal como se usa en este documento, el término «anticuerpo humanizado» significa que al menos una porción de las regiones marco de un constructo de inmunoglobulina o de anticuerpo manipulado genéticamente se deriva de secuencias de inmunoglobulina humana. Debe quedar claro que se puede utilizar cualquier método para humanizar anticuerpos o constructos de anticuerpos, como por ejemplo, la repavimentación de dominio variable (Roguska et al., 1994) o el injerto o reestructuración de CDR (Hurle et al., 1994).

10 [0032] Tal como se usa en el presente documento, el término «anticuerpo quimérico» se refiere a un constructo de anticuerpo manipulado genéticamente que comprende dominios variables de una especie (tales como dominios variables de ratón, rata, cabra, oveja, vaca, lama o camello), que pueden ser humanizados o no, y dominios constantes de otras especies (tales como dominios constantes humanos o de primates no humanos) (para una revisión, ver Hurle et al., 1994, supra). Debe quedar claro que se puede usar cualquier método conocido en la técnica para desarrollar anticuerpos quiméricos o constructos de anticuerpos.

15 [0033] En una realización de la invención, el anticuerpo es una murina IgG1 intacta, una IgG1 humana intacta mutada en la región constante para reducir o prevenir la activación del complemento o las interacciones del receptor Fc, o una IgG4 humana intacta.

20 [0034] En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es una subunidad de anticuerpo IgM monomérico.

25 [0035] En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no activa las vías clásicas o de lectina del complemento, y/o no interactúa con los receptores Fc.

30 [0036] En una realización de la invención, la molécula de unión es una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprende (i) un polipéptido de dominio de unión en forma de una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2.

35 [0037] Tal como se usa en este documento, en relación con los anticuerpos, el término «fragmento» o «fragmentos» se refiere a Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd (que consiste en los dominios V_H y C_{H1}), dAb (que consiste en un dominio V_H), una región determinante de complementariedad (CDR), por ejemplo, V_H CDR3 y otros fragmentos que conservan la función de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo parental. Los métodos para producir dichos fragmentos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Antibody Engineering, Oxford University Press, Oxford (1995) (1996) y Methods in Molecular Biology, Humana Press, Nueva Jersey (1995).

40 [0038] Tal como se usa en el este documento, el término «cadena sencilla de Fv», también denominado scFv, se refiere a los anticuerpos modificados mediante ingeniería genética preparados mediante el aislamiento de los dominios de unión (cadenas pesadas y ligeras) de un anticuerpo de unión, y el suministro de una fracción de enlace que permite la conservación de la función de unión. Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene solo la parte del dominio hipervariable necesaria para unirse al antígeno. La determinación y la construcción de anticuerpos de cadena sencilla se describen en, p. ej., patente EE. UU. N.º 4.946.778 de Ladner et al.

45 [0039] Tal como se usa en el presente documento, el término «proteína de unión a antígeno de dominio único» se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se derivan de anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. Pueden obtenerse anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, p. ej., mediante la inmunización de camélidos (por ejemplo, llamas) o tiburones (ver más adelante). Estos anticuerpos comprenden solo cadenas pesadas y están desprovistos de cadenas ligeras. La ventaja del uso de dichos anticuerpos de cadena pesada de dominio único es que son excepcionalmente estables incluso a temperaturas más altas, pequeños y fáciles de producir en organismos hospedadores microbianos como *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, una proteína de unión al factor XI de la invención comprende preferiblemente un dominio variable derivado de inmunoglobulina que comprende un sitio de unión a antígeno completo para un epítipo en una molécula diana en una única cadena polipeptídica. Dichas proteínas de unión al factor XI entre otras incluyen específicamente:

- 50
- 1) Anticuerpos que se pueden obtener de camélidos y tiburones que consisten solo en cadenas pesadas y que están desprovista naturalmente de cadenas ligeras;
 - 2) dominios variables de los anticuerpos definidos en 1), generalmente denominados dominios VHH (ver WO2006/040153);
- 65

3) formas modificadas por ingeniería genética de los anticuerpos definidos en 1) o los dominios en 2) tales como, por ejemplo, los anticuerpos «camelidizados» en los que las secuencias marco de un dominio VHH de camélido (o tiburón) están injertadas con CDR obtenidas de otras fuentes;

4) formas diseñadas genéticamente de dominios variables de tipo inmunoglobulina en las que se combinan secuencias marco de una variedad de moléculas de tipo inmunoglobulina se combinan con CDR específicas para una molécula diana determinada, p. ej., como se describe en WO 04/108749.

[0040] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden obtenerse aislando células inmunitarias de un animal inmunizado con factor XI humano o con factor XI humano activado (factor XIa), o con partes de estas moléculas, e inmortalizando estas células para producir líneas celulares secretoras de anticuerpos, tales como los hibridomas. Las líneas celulares que producen los anticuerpos deseados pueden identificarse seleccionando los sobrenadantes del cultivo para determinar la presencia de actividad de anticuerpos, y estableciendo el efecto del anticuerpo seleccionado sobre la actividad funcional del factor XI.

[0041] El factor XI humano, el factor XIa, sus fragmentos y/o los péptidos sintéticos que comprenden secuencias de aminoácidos del factor XI, aislados de acuerdo con una variedad de métodos de purificación, pueden usarse para inmunizar un animal huésped apropiado.

[0042] Se puede emplear una variedad de protocolos de inmunización, y pueden consistir en inmunización intravenosa, subcutánea o intraperitoneal, seguida de uno o más refuerzos. Un adyuvante adecuado es el adyuvante de Freund. El calendario preciso de administración del factor humano XI, del factor XIa o de fragmentos de los mismos al animal huésped en general no está bien definido. La elección del procedimiento de inmunización es más dependiente de las respuestas de anticuerpos del animal huésped al factor XI administrado, según lo medido por un ensayo adecuado (*vide supra*). Sin embargo, un procedimiento de inmunización adecuado es la hiperinmunización con factor XI humano o factor XIa o fragmentos de los mismos a una concentración que, dependiendo del animal huésped, puede estar en el rango de 10 a 500 microgramos, mezclado con adyuvante completo de Freund. La mezcla se inyecta por vía subcutánea. Las inyecciones se repiten de 2 a 5 veces utilizando el mismo preparado de factor XI mezclado con el adyuvante incompleto de Freund. Se toman muestras de sangre del animal una semana después de las inyecciones 3^a, 4^a, 5^a inyección, y se analizó la presencia de anticuerpos contra el factor XI. En un esquema como el indicado anteriormente, la duración del intervalo entre las inyecciones puede variar. También se pueden usar adyuvantes alternativos.

[0043] Alternativamente, los linfocitos, humanos o murinos u otros, pueden inmunizarse *in vitro*, como, por ejemplo, puede lograrse mediante un procedimiento descrito por Voss B, 1986 y en EPA 8610791.6. También se han descrito otros procedimientos: (Luben et al., 1980; Reading, 1986; Reading, 1982). Como fuente de linfocitos humanos, se pueden usar los obtenidos de pacientes con anticuerpos contra el factor XI humano, por ejemplo, de personas con deficiencia de factor XI que han desarrollado respuestas de anticuerpos contra el factor XI exógeno administrado (O Salomon et al., Blood 2003; 101: 4783-4788).

[0044] Un enfoque alternativo para la inmunización comprende el uso de péptidos sintéticos que imitan la secuencia de sitios funcionales del factor XI, como los dominios manzana individuales. Los métodos para producir anticuerpos contra péptidos son bien conocidos en la técnica y generalmente requieren el acoplamiento de los péptidos a una molécula portadora adecuada, por ejemplo, albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa californiana. Los péptidos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. El procedimiento también puede usar máquinas sintetizadoras de péptidos comercialmente disponibles.

[0045] Además, la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo se puede usar como una fuente de ADN o ARNm que codifica el anticuerpo deseado, que se puede aislar y transferirse a las células mediante técnicas genéticas conocidas para producir un anticuerpo por ingeniería genética.

[0046] La etapa de selección inicial de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas obtenidos por fusión de linfocitos de ratones inmunizados con factor XI, factor XIa, partes de los mismos, o con péptidos de factor XI, con un compañero de fusión apropiado, se realiza preferiblemente mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). Ambos ensayos son conocidos por los expertos en la técnica, y consisten en el acoplamiento de los factores XI o XIa humanos a una matriz en fase sólida y el ensayo de la unión del anticuerpo a los factores XI o XIa por parte un segundo anticuerpo marcado. En el caso de que se usen péptidos para la inmunización, los péptidos acoplados a una matriz en fase sólida también se pueden usar en estos ensayos.

[0047] El ensayo preferido es un ensayo de absorción ligado a enzimas en el que el factor humano purificado XI o factor XIa (JF Tait et al., J BiolChem 1987; 262: 11651-11656) se utiliza para el revestimiento, y que se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por (Smeenck RTJ, et al. 1987, Arthr Rheum 30: 607), que comprende una etapa de incubación con los sobrenadantes de hibridoma y una etapa de incubación con el reactivo de inmunoglobulina anti-ratón marcado.

[0048] Posteriormente, se puede usar un procedimiento de selección alternativo para evaluar si el anticuerpo seleccionado puede unirse al factor XI o al factor XIa en solución. Esto se logra mediante un método en el que un agente antiinmunoglobulina se acopla a una matriz en fase sólida, y los anticuerpos unidos contra el factor XI o el factor XIa se detectan específicamente utilizando el factor XIa o el factor XIa purificados y marcados. Un procedimiento de radioinmunoensayo adecuado para seleccionar anticuerpos antifactor XI o antifactor XIa puede ser el descrito para la detección de anticuerpos antiC3 por (Hack et al., J Immunol. 1988; 141: 1602-9). Alternativamente, las soluciones que contienen factor XI o factor XIa humanos pueden incubarse con el anticuerpo acoplado a una matriz en fase sólida a través de un reactivo antiinmunoglobulina. La matriz se lava después y los factores XI o XIa unidos se disocian de ella. El factor XI o el factor XIa eluidos se detectan luego mediante SDS-PAGE seguido de transferencia de Western.

[0049] Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse de varias formas adicionales con técnicas bien entendidas por los expertos en la técnica. Los detalles de estas técnicas se describen en (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., Cold Spring Harbor Publications, pág. 726,1988), o son descritos por (Campbell, A.M. «Monoclonal Antibody Technology Techniques in Biochemistry and Molecular Biology», Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, Países Bajos, 1984) o por (St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35: 1-21, 1980). Estas otras técnicas incluyen, entre otras, técnicas para la producción recombinante de anticuerpos monoclonales.

[0050] Los anticuerpos monoclonales de cualquier especie de mamífero, incluidos los seres humanos, se pueden usar en esta invención. Por consiguiente, los anticuerpos según esta realización pueden ser anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse, por ejemplo, mediante la generación de hibridomas, derivados de animales transgénicos inmunizados, que contienen grandes secciones de los loci del gen de la inmunoglobulina (Ig) humana en la línea germinal, integrados por la tecnología cromosómica artificial de la levadura (YAC) (Méndez et al., 1997).

[0051] Además, se puede hacer referencia a (Lonberg et al., 1995) y a las patentes de EE.UU. n.º 5.625.126; n.º 5.633.425; n.º 5.569.825; n.º 5.661.016 y n.º 5.545.806.

[0052] Los métodos adecuados para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito en WO 04/035607 (Genmab) y WO 04/043989 (Medarex). Otros métodos similares se han descrito en WO 03/017935 (Genmab), WO 02/100348 (Genmab), WO 02/064634 (Medarex) y WO 03/040169 (Medarex).

[0053] Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado también pueden generarse utilizando una técnica denominada «selección guiada». En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, p. ej., un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., 1994).

[0054] Además, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que pueden prepararse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, están dentro del alcance de la invención. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, como aquellos que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, véase, p. ej., EE. UU. 4.816.567 y US 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de manera complementaria de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana, véase, p. ej., EE. UU. 5.585.089. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando métodos descritos en WO 87/02671; EP 184 187; EP 171 496; EP 173.494; WO 86/01533; EE. UU. 4.816.567; EP 125.023; (Better et al., 1988); (Liu et al., 1987); (Liu et al., 1987); (Sun et al., 1987); (Nishimura et al., 1987); (Wood et al., 1985); y (Shaw et al., 1988); (Morrison, 1985); (Oi et al., 1986); patente EE. UU. n.º 5.225.539; (Jones et al., 1986); (Verhoeyen et al., 1988); (Beidler et al., 1988) y (Kwon et al., 2002).

[0055] Además, la presente invención también comprende anticuerpos en los que se han realizado una o más alteraciones en la región Fc para cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Dichas alteraciones pueden dar como resultado una disminución o un aumento de la unión de C1q y de la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) o de la unión de FcγR y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las sustituciones se pueden hacer, por ejemplo, en una o más de las posiciones de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 de la región constante de la cadena pesada, causando así una alteración en una función efectora mientras se mantiene la unión a antígeno en comparación con el anticuerpo no modificado, cf. EE. UU. 5.624.821 y EE. UU. 5.648.260. Se puede hacer referencia adicional a WO 00/42072 que describe anticuerpos con regiones Fc alteradas que aumentan la ADCC, y WO 94/29351 que describe anticuerpos que tienen mutaciones en la región N-terminal del dominio CH2 que alteran la capacidad de los anticuerpos para unirse a FcR y, por lo tanto, disminuye la capacidad de los anticuerpos para unirse a C1q, lo que a su vez disminuye la capacidad de los anticuerpos para fijar el complemento. Se prefieren especialmente

las alteraciones que previenen o reducen la activación del complemento a través de la región constante de los anticuerpos.

5 [0056] Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse usando una técnica que se ocupa de la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Esto incluye, entre otras, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (Kohler et al., 1975).

10 [0057] Los anticuerpos humanos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de células huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes bien conocidos en la técnica, véase, p. ej., (Morrison, 1985).

15 [0058] Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se puede obtener ADN que codifica cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa mediante técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR, mutagénesis dirigida) y se pueden insertar en vectores de expresión. de tal manera que los genes están operativamente enlazados a las secuencias de control de transcripción y traducción. En este contexto, el término «operativamente enlazado» pretende significar que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de tal manera que las secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector cumplen su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con la expresión de la célula huésped utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, la ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligadura de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en este documento se pueden usar para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H está operativamente enlazado al(a los) segmento(s) C_H dentro del vector y el segmento V_L está operativamente enlazado al segmento C_L dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped.

20
25
30

35 [0059] El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal esté enlazado en el marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir., un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

40 [0060] Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término «secuencia reguladora» pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlen la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpos. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California. (1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus, (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Alternativamente, se pueden usar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de beta-globina.

45
50

55 [0061] Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, como las secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (ver, por ejemplo, EE. UU. 4.399.216, EE. UU. 4.634.665 y EE. UU. 5.179.017, todas por Axel et al.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los medicamentos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

60

65 [0062] Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el(los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras se transfecta(n) en una célula huésped mediante técnicas estándar. Se pretende que las diversas formas del término «transfección» abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas

para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección con DEAE dextrano, transfección con lipofectina y similares.

5 [0063] En una realización, los anticuerpos se expresan en células eucariotas, tales como células huésped de mamíferos. Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo las células dhfr-CHO, descritas en (Urlaub et al., 1980), usadas con un marcador seleccionable de DHFR, p. ej., como se describe en (R. J. Kaufman et al., 1982), células de mieloma NS/O, células COS, células HEK293 y células SP2.0. En particular para uso con células de mieloma NS/O, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS (glutamina sintetasa) descrito en
10 WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.

[0064] Alternativamente, los genes de anticuerpos clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procariotas, tales como microorganismos, por ejemplo, *E. coli* para la producción de anticuerpos scFv, algas, así como células de insectos. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, como en la leche de oveja y conejo o en huevos de gallina, o en plantas transgénicas. Ver, por ejemplo, (Verma, et al., 1998); (Pollock et al., 1999); y (Fischer et al., 1999).

[0065] Se puede encontrar información adicional sobre la generación, diseño y expresión de anticuerpos recombinantes en (Mayforth, Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993)).

25 [0066] Independientemente de la naturaleza del anticuerpo, policlonal, monoclonal o recombinante, se puede purificar mediante técnicas estándar bien conocidas en la técnica. La mayoría de estas técnicas utilizan cromatografía de afinidad, a menudo en combinación con una etapa de precipitación.

30 [0067] Las líneas celulares que secretan anticuerpos contra los factores XI o XIa humanos pueden identificarse analizando sobrenadantes de cultivo, líquido ascítico, etc. para detectar la presencia de anticuerpos. El procedimiento de selección preferido comprende dos pasos secuenciales. El primero es la identificación de hibridomas que secretan mAb contra los factores XI o XIa humanos, y el segundo es la determinación de la capacidad del mAb para inhibir la activación o la actividad funcional del factor XI y para prevenir o reducir la activación del factor IX y el resto del sistema de coagulación. Se pueden producir diacuerpos, triacuerpos y anticuerpos tetravalentes de la invención de unión al factor XI mediante los siguientes métodos: 1) enlace químico de anticuerpos antifactor XI de la presente invención o fragmentos univalentes de los mismos siguiendo un método como el descrito, p. ej., por (Fanger MW, Morganelli PM, Guyre PM. Bispecific antibodies. Crit Rev Immunol. 1992; 12: 101-24); 2) ingeniería genética de diacuerpos no unidos por enlaces covalentes como describen, p. ej., (Holliger P, Prospero T, Winter G. «Diabodies»: small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 6444-8) y anticuerpos tetravalentes como describen, p. ej., (Pack P, Muller K, Zahn R, Pluckthun A. Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli*. J Mol Biol. 1995; 246: 28-34); 3) anticuerpos de cadena sencilla fusionados a la proteína A o estreptavidina como describen, p. ej., (Kipriyanov et al., Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. Protein Eng. 1996; 9 (2): 203-11) y anticuerpos tetravalentes biespecíficos como se describe en, p. ej., EP 0 517 024 de Bosslet y Seeman; 4) ingeniería genética de triacuerpos como describen, p. ej., (Kortt et al., Triabodies: single chain Fv fragments without a linker form trivalent trimers. FEBS Lett. 1997; 409 (3): 437-41); 5) presentación sobre fagos de bibliotecas combinatorias de anticuerpos que da como resultado la producción de anticuerpos de alta afinidad y la selección de bibliotecas de presentación sobre fagos de secuencias aleatorias de ADN para pequeños péptidos de unión a antígeno como se describe en, por ejemplo, patente EE. UU. n.º 5.403.484, n.º 5.571.698 y n.º 5.223.409, (McGuinness et al., Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments. Nat Biotechnol. 1996; 14 (9): 1149-54), (Hoogenboom HR. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. Trends Biotechnol. 1997; 15 (2): 62-70); y, 6) generación de hibridomas derivados de ratones transgénicos inmunizados, que contienen grandes secciones de los loci del gen de la inmunoglobulina humana (Ig) en la línea germinal, integrados por la tecnología del cromosoma artificial de la levadura (YAC), que da como resultado anticuerpos bloqueadores efectivos como describen, p. ej., (Mendez et al., 1997, Nat Genet. 15 (2): 146-56. Errata en: Nat Genet 1997, 16 (4):410).

60 [0068] Por lo tanto, la invención se refiere a métodos para prevenir o tratar una enfermedad, un trastorno y/o una afección mediados por la activación del factor XI y/o en los que la inhibición del factor XI tiene un efecto beneficioso. Los métodos comprenden preferiblemente la etapa de administración a un sujeto de una molécula de unión como se ha descrito anteriormente en este documento, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

65

[0069] También en este aspecto, la invención además se refiere al uso de una molécula de unión como se ha descrito anteriormente en este documento para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad, un trastorno y/o una afección mediados por la activación del factor XI y/o en los que la inhibición del factor XI tiene un efecto beneficioso.

[0070] En este aspecto, la invención se refiere alternativamente a una molécula de unión como la descrita anteriormente en este documento, para el uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad, un trastorno y/o una afección mediados por la activación del factor XI y/o en los que la inhibición del factor XI tiene un efecto beneficioso.

[0071] En una realización, una enfermedad, un trastorno y/o una afección mediados por la activación del factor XI y/o en los que la inhibición del factor XI tiene un efecto beneficioso son una enfermedad, un trastorno y/o una afección en los que está implicada la coagulación, tal como, por ejemplo, una enfermedad tromboembólica o inflamatoria mediada por la activación de la coagulación a través del factor XI. Por lo tanto, en esta realización, las moléculas de unión de la invención se pueden usar en un tratamiento para reducir o prevenir la formación de trombos y/o sus complicaciones.

[0072] Según otra realización, las moléculas de unión de la presente invención se pueden usar para inhibir la coagulación en diversas enfermedades humanas. Como resultado, los inhibidores de la presente invención pueden usarse para la preparación de un medicamento que atenúe los trastornos tromboembólicos mediante la inhibición de la coagulación *in vivo*. Las moléculas de unión pueden usarse solas o en combinación con otros fármacos.

[0073] En una realización adicional, las moléculas de unión de la presente invención se pueden usar solas o en combinación con otros fármacos en cualquier proporción adecuada, para la preparación de un medicamento con el fin de tratar a un sujeto que padece una enfermedad o síntomas de la enfermedad resultantes de trombosis patológica y/o embolia, o que está en riesgo con respecto a tal enfermedad.

[0074] Las presentes moléculas de unión inhiben la amplificación de la coagulación dependiente del factor XI o la coagulación dependiente del factor XI mediante la inhibición de la activación y/o la actividad del factor XI.

[0075] Por lo tanto, son adecuadas para la prevención o el tratamiento de trastornos, enfermedades y afecciones en las que está implicada la coagulación. Estos trastornos, enfermedades y afecciones incluyen, p. ej., infarto de miocardio (agudo), accidente cerebrovascular isquémico, cardioembolismo debido a fibrilación auricular, trombosis de acceso vascular, trombosis venosa profunda, trombosis arterial, trombosis de la arteria coronaria, aterosclerosis, artritis, vasculitis, síndrome de dificultad respiratoria, embolia pulmonar, tromboembolismo causado por una cirugía como la cirugía de próstata, cirugía ortopédica, como por ejemplo reemplazo de cadera y rodilla, tromboembolia resultante de inmovilización, trombosis y oclusión de injertos sintéticos, stents o fístula AV, coagulación intravascular difusa (CID), hemodiálisis, fibrilación auricular, sepsis, shock séptico, insuficiencia orgánica, insuficiencia renal, insuficiencia renal, toxicidad inducida por la administración *in vivo* de proteínas terapéuticas (por ejemplo, citoquinas o mAbs), traumatismo múltiple, lesiones por isquemia-reperusión y deposición local no deseada de fibrina como, por ejemplo, la deposición de fibrina en los alvéolos pulmonares durante la dificultad respiratoria del adulto.

[0076] Así, en la presente invención, a los pacientes que padecen una enfermedad que implica daño mediado por la coagulación se les puede administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal contra el factor XI, o fragmentos de un anticuerpo monoclonal contra el factor XI como se ha descrito, de modo que se inhibe la activación del factor XI. Por «cantidad eficaz» se entiende una concentración de la molécula de unión que es capaz de inhibir la activación de la coagulación.

[0077] El tratamiento (profiláctico o terapéutico) generalmente consistirá en administrar una molécula de unión de la invención por vía parenteral, preferiblemente por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular o subcutánea. Gruber y Hanson (Gruber y Hanson, 2003, Blood 102: 953-955) administraron anticuerpos antifactor XI de cabra en una dosis de 16-50 mg por kg para lograr una inhibición suficiente del factor XI en babuinos. En contraste, la dosis y el régimen de administración de una molécula de unión de la invención están preferiblemente en el rango de una dosis que es equivalente a una dosis de 0.5 a 20 mg de IgG por kg de peso corporal por semana. Más preferiblemente, una molécula de unión de la invención se administra en una dosis que es equivalente a una dosis de menos de 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 mg de IgG por kg de peso corporal por semana y/o a una dosis que es equivalente a una dosis de al menos 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2 o 4 mg de IgG por kg de peso corporal por semana. Se entiende que en caso de, p. ej., los fragmentos de anticuerpos la dosis que se utilizará será el equivalente molar de la cantidad correspondiente de mg de una molécula de IgG por kg de peso corporal, según se indica.

[0078] Se entiende además que los regímenes de dosificación para las moléculas de unión de la invención se basan en la semivida media en suero de un anticuerpo humano de aproximadamente 7 días. El experto sabrá

cómo ajustar el régimen de dosificación de las moléculas de unión con una semivida más corta o más larga de 7 días.

5 [0079] Un factor adicional que influye en el régimen de dosificación para una molécula de unión dada de la invención es su afinidad por el factor XI. Por ejemplo, una molécula de unión que tiene una Kd de aproximadamente 1 nM requiere un nivel sérico de aproximadamente 100 nM para producir un 99 % de inhibición del factor XI y una molécula de unión que tiene una Kd de aproximadamente 0.1 nM requiere un nivel sérico de aproximadamente 35 nM para producir un 99 % de inhibición del factor XI. Por otro lado, se puede lograr un 95 % de inhibición del factor XI con una molécula de unión que tiene una Kd de aproximadamente 1 nM a un nivel en suero de aproximadamente 50 nM o a 27 nM con una molécula de unión que tiene una Kd de aproximadamente 0.1 nM. La tabla 1 muestra los regímenes de dosificación para la molécula de unión al antifactor XI por kg de peso corporal como función de Kd y del intervalo entre administraciones.

15 Tabla 1. Dosis de mAb anti/FXI (anticuerpo intacto) por kg de peso corporal como función de Kd y del intervalo entre administraciones para la IgG humana intacta con una semivida de 7 días requerida para una inhibición del 99 % del factor XI en circulación.

Intervalo entre administraciones	Dosis (mg/kg)		
	Kd 0.1 nM	Kd 1 nM	Kd 10 nM
Nivel mínimo de mAb en plasma para lograr una inhibición del 99 %.	35 nM (= 0.005 mg/ml)	125 nM (= 0.02 mg/ml)	1025 nM (= 0.2 mg/ml)
1 semana	0.5 mg/kg de peso corporal	2 mg/kg de peso corporal	10 mg/kg de peso corporal
2 semanas	1 mg/kg de peso corporal	4 mg/kg de peso corporal	20 mg/kg de peso corporal
3 semanas	2 mg/kg de peso corporal	8 mg/kg de peso corporal	40 mg/kg de peso corporal
4 semanas	4 mg/kg de peso corporal	16 mg/kg de peso corporal	80 mg/kg de peso corporal

20 [0080] En una realización adicional, la molécula de unión se administra en una dosis en la que la inhibición de la activación del factor XI en un fluido corporal humano se puede medir como (a) un bloqueo sustancialmente completo de la activación del factor IX en el fluido corporal; y/o (b) un bloqueo sustancialmente completo de la generación de trombina en el fluido corporal. Un bloqueo sustancialmente completo de la activación del factor IX y/o de la generación de trombina se entiende en este documento como una reducción en la activación del factor IX y/o en la generación de trombina hasta quedar por debajo de un 1 % de la cantidad de activación del factor IX y de la generación de trombina en ausencia de la molécula de unión en el fluido corporal.

30 [0081] Una dosis administrada que efectúa un bloqueo sustancialmente completo de la activación del factor IX y/o de la generación de trombina es, preferiblemente, una dosis que produce una relación molar en el fluido corporal que es igual o menor que 35, 4 o 1 moles de sitios de unión del factor XI de la molécula de unión a 1 mol del factor XI, en donde los sitios de unión del factor XI de la molécula de unión tienen una Kd que es igual o menor que 10 nM, 1 nM o 0.1 nM, respectivamente. El fluido corporal se entiende en este documento como sangre, plasma o suero.

35 [0082] El experto sabrá cómo ajustar los regímenes de dosificación de la tabla 1 para las moléculas de unión con una semivida más corta o más larga que 7 días, con una M_w diferente de la IgG humana, con una Kd diferente de 10 nM, 1 nM o 0.1 nM y/o para lograr otro porcentaje de inhibición del factor circulante XI.

40 [0083] En una realización adicional, una molécula de unión de la invención, cuando se administra a un paciente humano mediante infusión intravenosa, proporciona una inhibición completa del factor XI en dosis inferiores a 0.005 o 0.003 g/kg.

45 [0084] En una realización adicional, una molécula de unión de la invención, cuando se administra a un paciente humano mediante infusión intravenosa, proporciona beneficios terapéuticos en dosis inferiores a 0.005 o 0.003 g/kg.

50 [0085] En una realización adicional, una molécula de unión de la invención se modifica para lograr una semivida deseada en suero in vivo. Para este propósito, un grupo de polialquilenglicol (por ejemplo, un grupo de polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polibutilenglicol) o una proteína sérica tal como, por ejemplo, la albúmina o la transferrina séricas se pueden enlazar o conjugar con la molécula de unión y/o la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión se puede modificar. En particular, la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de una molécula de unión que es un anticuerpo puede modificarse (por ejemplo, introduciendo sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos). Estas modificaciones se pueden utilizar para lograr

una semivida en suero in vivo de la molécula de unión de más de 20 días, de 10 a 20 días, de 5 a 10 días, de 1 a 5 días o de menos de 24 horas.

5 [0086] En una realización, el equivalente de las dosis semanales indicadas anteriormente de las moléculas de unión según la invención se puede administrar por infusión. Dicha administración puede repetirse tantas veces como se desee. La administración se puede realizar mediante inyección en bolo o infusión o infusión continua durante un período de menos de 2 horas hasta a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. En otra realización, las moléculas de unión de la invención pueden administrarse por infusión continua lenta durante un largo período, por ejemplo, más de 24 horas.

10 [0087] Dicho régimen puede continuarse o repetirse una o más veces, según sea necesario, por ejemplo, después de 6 o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de moléculas de unión al factor XI circulantes de los anticuerpos de la invención tras la administración en una muestra biológica usando anticuerpos antiidiotípicos que tienen como objetivo las moléculas de unión al factor XI de la invención. 15 En otra realización más, los anticuerpos pueden administrarse mediante terapia de mantenimiento, como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

[0088] En una realización, la molécula de unión de la invención se usa en la prevención o reducción de la trombosis (y oclusión) de injertos sintéticos, stents o fístula AV en, por ejemplo, pacientes renales sometidos a diálisis regular. En este grupo de pacientes, la molécula de unión puede administrarse por lo menos 20 semanalmente o varias veces por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4), preferiblemente cuando los pacientes se someten a diálisis. En una realización preferida, la molécula de unión se administra al paciente a través del aparato de diálisis, p. ej., en el fluido corporal dializado que se devuelve al paciente.

25 [0089] En otra realización, la molécula de unión de la invención se administra a pacientes sin acceso parenteral normal que requieren, sin embargo, una terapia anticoagulante continua, como, por ejemplo, pacientes con fibrilación auricular, angina de pecho inestable, trombosis venosa profunda, coagulación intravascular difusa, cirugía de próstata, cirugía ortopédica, en particular de la cadera, y otros trastornos tromboembólicos. En estos 30 pacientes, preferiblemente se aplica un cierto número de administraciones de la molécula de unión por período de tiempo, por ej., Una vez cada 2, 3, 4 o 6 semanas. En tales casos, la molécula de unión tiene preferiblemente una semivida de al menos 6, 7, 8, 10, 12 o 14 días y una Kd menor que 1 nM, preferiblemente menor que 0.5 nM, y lo más preferible menor que 0.1 nM.

[0090] Para la administración parenteral, la molécula de unión se formulará en una forma inyectable combinada 35 con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son bien conocidos en la técnica y los ejemplos incluyen solución salina, solución de dextrosa, solución de Ringer y soluciones que contienen pequeñas cantidades de albúmina de suero humano.

[0091] Típicamente, el anticuerpo monoclonal o fragmentos del mismo se formularán en tales vehículos a una 40 concentración de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100 mg por ml. En una realización de esta invención, la molécula de unión se administra mediante inyección intravenosa.

[0092] Debe entenderse que se pretende que virtualmente cada método de administración de anticuerpos 45 monoclonales o fragmentos de los mismos como se describe en la presente invención esté dentro del alcance de esta invención para producir niveles suficientemente altos en la circulación o localmente.

[0093] En un segundo aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una 50 molécula de unión como se describe anteriormente en este documento y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995).

[0094] Las composiciones farmacéuticas según la divulgación pueden formularse de acuerdo con procedimientos 55 de rutina para administración por cualquier vía, tal como oral, tópica, parenteral, sublingual, transdérmica o por inhalación. Las composiciones pueden estar en forma de pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, píldoras, cremas o preparaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones parenterales orales o estériles o en forma de aerosol, spray u otro método convencional de inhalación.

[0095] El término «portador farmacéuticamente aceptable» se refiere a portadores o excipientes, que son 60 inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Ejemplos de tales excipientes son, entre otros, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. También se pueden usar excipientes no acuosos tales como aceites fijos y oleato de etilo. Un excipiente preferido es dextrosa al 5 % en solución salina. El excipiente puede contener cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y 65 la estabilidad química, incluidos los tampones y los conservantes.

[0096] La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía y modo adecuados. Como apreciarán los expertos en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral.

[0097] Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen los vehículos que se sabe que son apropiados en la técnica.

[0098] Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de composiciones de esta invención incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes.

[0099] La composición farmacéutica se administra preferiblemente por vía parenteral. Las frases «administración parenteral» y «administrada por vía parenteral» tal como se usan en este documento significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

[0100] En una realización, esa composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

[0101] En una realización, el anticuerpo de la invención se administra en forma cristalina por inyección subcutánea, cf. (Yang et al., 2003 PNAS, 100 (12): 6934-6939).

[0102] Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en una forma farmacéuticamente aceptable de dosificación mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

[0103] Tal como se usa en este documento, «portador farmacéuticamente aceptable» incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, agentes antioxidantes y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles.

[0104] Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención.

[0105] Preferiblemente, el portador es adecuado para administración parenteral, p. ej., inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

[0106] Las composiciones farmacéuticas típicamente deben ser estériles, no pirogénicas y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de surfactantes.

[0107] Las composiciones farmacéuticas también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones. También se pueden incluir antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, etilendiamina, ácido tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

[0108] La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

5 [0109] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes, p. ej., como los
 10 enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración de esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, p. ej., de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada y filtrada del mismo. .

15 [0110] Si es apropiado, la molécula de unión se puede usar en una forma hidratada adecuada o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Una «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (Berge, S.M., et al., (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fósforo y similares, así como de
 20 ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

25 [0111] Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, la molécula de unión, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un portador apropiado, p. ej., liposomas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 1984; 7:27).

30 [0112] Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

40 [0113] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica.

[0114] Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas, tal como los dispositivos descritos en EE. UU. 5.399.163, EE. UU. 5.383.851, EE. UU. 5.312.335, EE. UU. 5.064.413, EE. UU. 4.941.880, EE. UU. 4.790.824 o EE. UU. 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos, útiles en la presente invención incluyen: EE. UU. 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; EE. UU. 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; EE. UU. 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión precisa; EE. UU. 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; EE. UU. 4.439.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y EE. UU. 4.475.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

55 [0115] En otra realización, las moléculas de unión de la invención pueden formularse para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto se puede hacer por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante PEGilación de los anticuerpos o usando fragmentos de F(ab')₂. Se pueden hacer referencias adicionales a (Cunningham-Rundles C et al, 1992); y a (Landor, 1995).

60 [0116] Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación tal como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas

adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociada con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se debe lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de composición de tales compuestos activos para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

[0117] Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, la hora de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en la medicina.

[0118] Un médico o veterinario que tenga experiencia en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será la cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea.

[0119] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo «comprender» y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitante para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, la referencia a un elemento por los artículos indefinidos «un» o «una» no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. De este modo, los artículos indefinidos «un» o «una» significan «al menos uno».

[0120] Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Materiales

[0121] El factor XI, el factor XIa, el factor XII, el factor beta XIII y el factor IX humanos se obtuvieron de Kordia Life Science, Leiden, Países Bajos. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE al 12 % usando tinción con plata.

[0122] S299 (metil-sulfonil-D-ciclohexilglicil-glicil-arginina)-*p*-nitroanilida) era de American Diagnostics (Greenwich, CT) y S2366 (L-piroglutamil-L-prolil-L-arginina-*p*-nitroanilida) era de Diapharma (West Chester, OH).

[0123] La aprotinina y la *p*-aminobenzamidina (*p*AB) eran de Sigma (St. Louis, MO).

Ejemplo 1: Ensayo cromogénico para factor XIa

[0124] Una mezcla de 75 μ L de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.4, que contiene el sustrato cromogénico S-2366 1 mmol/L (concentración final), 5 μ L de factor XIa a diferentes concentraciones finales (rango, 0.01 - 10 nmol/L) y 20 μ L de PBS se agrega a los pocillos de las placas de microtitulación (Dynatech, Plochingen, Alemania). La conversión del sustrato se mide utilizando un espectrofotómetro. Las placas de microtitulación se leen en un lector de placas Multiskan (Labsystems, Helsinki, Finlandia) después de la incubación durante varios intervalos de tiempo a temperatura ambiente a 405 nm. El efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la actividad cromogénica se logra mediante la preincubación de 5 μ L de factor XIa a una concentración final de 1 nmol/L con 20 μ L de PBS que contiene diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal que se examinarán durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 75 μ L de PBS que contiene S2366 y la conversión del sustrato se mide como se ha descrito anteriormente. Una referencia que consiste en varias diluciones de factor XIa (0.1 - 1 nmol/L) se prueba como control. En el caso de anticuerpos que inhiben el sitio activo del factor XIa, se observa una disminución en la tasa de conversión por la cantidad estándar de factor XIa. Este ensayo es el ensayo 1 descrito en el ejemplo 8.

Ejemplo 2: ensayo cromogénico para la activación del factor XI por el factor XIIa

[0125] Se incuban cinco μL de PBS que contiene factor XI de 10 nm con 5 μL de 1 nMol/L de factor XIIa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregan 75 μL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.4, que contiene el sustrato cromogénico S-2366 1 mmol/L (concentración final) y 15 μL de PBS a los pocillos de las placas de microtitulación (Dynatech, Plochingen, Alemania). La conversión del sustrato se mide utilizando un espectrofotómetro. Las placas de microtitulación se leen en un lector de placas Multiskan (Labsystems, Helsinki, Finlandia) después de la incubación durante varios intervalos de tiempo a temperatura ambiente a 405 nm. El efecto de los anticuerpos monoclonales en la activación se prueba agregando 15 μL de PBS que contiene el anticuerpo que se va analizar a la mezcla de factor XI y factor XIIa, de manera que primero se agrega el anticuerpo al factor XI y después de 15 minutos de incubación se añade factor XIIa. Las diluciones del factor XIIa se prueban como control. Luego se agregan 75 μL de PBS que contiene S2366 y la conversión del sustrato se mide como se ha descrito anteriormente. Una referencia que consiste en varias diluciones de factor XIIa (0.1 - 1 nmol/L) también se prueba como control. En el caso de anticuerpos que inhiben la activación del factor XI, se observa una disminución en la tasa de conversión por la cantidad de factor XIIa generada por el factor XIIa. Este ensayo se denomina ensayo 2 en la tabla 2.

Ejemplo 3: ensayo cromogénico para la activación del factor IX por el factor XIa

[0126] Este ensayo se realiza esencialmente como lo describen T Ogawa et al., J Biol Chem 2005; 280: 23523-30. Resumiendo, el factor IX (1000 nM) en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 que contiene 0.1 mg por ml de BSA que contiene CaCl_2 5 mM se activó añadiendo factor XIa (sitios activos 1 nM, proteína 0.5 nM). En diferentes momentos (0 - 240 minutos), se retiraron alícuotas de 50 μl y se suplementaron con aprotinina (concentración final 15 μM) para inhibir el factor XIa. La cinética en estado estable de la hidrólisis de S299 (1 mM) por medio de muestras enfriadas se estudió en un tampón Tris-BSA que contenía CaCl_2 5 mM y 33 % de etilenglicol. Se midieron los cambios en la absorbancia a 405 nm. Se realizaron ensayos duplicados. La concentración de factor IX examinada en el ensayo fue 1000 nM. La generación del factor IXa en función del tiempo se determinó por interpolación a partir de la dependencia lineal de la tasa inicial de hidrólisis de S299 en concentraciones conocidas de factor IXa. Las tasas iniciales en estado estable de la formación del factor IXa se determinaron a partir de las pendientes de las gráficas que documentan el aspecto lineal del factor IXa con el tiempo. El efecto de los anticuerpos monoclonales en el ensayo se prueba mediante preincubación del factor XIa con un volumen igual de anticuerpo monoclonal.

[0127] Este ensayo se denomina ensayo 3 en la tabla 2.

Ejemplo 4: Ensayo de coagulación para el factor XI

[0128] El efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la actividad de coagulación del factor XI o del factor XIa se prueba mediante la incubación del factor XI o del factor XIa con un volumen igual de PBS que contiene un exceso de 1 a 10 molar de anticuerpo contra el factor XI. La actividad de coagulación del factor XI se prueba luego con un ensayo de coagulación de una etapa. Estos ensayos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos ensayos se denominan ensayo 4 en la tabla 2 cuando se realizan con factor XI y ensayo 5 cuando se realizan con factor XIa.

Ejemplo 5: Inmunización con inmunógenos del factor XI o del factor XIa humanos y la producción de hibridomas

[0129] A continuación se describe la inmunización de ratones con factor XI humano purificado con el objetivo de aislar linfocitos de los ratones inmunizados y producir hibridomas murinos. Se apreciará además que el procedimiento puede emplearse para producir anticuerpos contra el factor XI, el factor XIa o fragmentos de los mismos.

[0130] Un procedimiento adecuado para la inmunización es descrito por (Hack CE, Paardekooper J, Smeenk RJ, Abbink J, Eerenberg AJ, Nuijens JH. Disruption of the internal thioester bond in the third component of complement (C3) results in the exposure of neodeterminants also present on activation products of C3. An analysis with monoclonal antibodies. J Immunol. 1988; 141: 1602-9), para C3. Se utiliza un procedimiento similar para los factores XI o XIa. Resumiendo, los ratones se inmunizan mediante inyecciones intraperitoneales repetidas de 25 μg de los factores XI o XIa humanos purificados administrados a intervalos de tres semanas. El primer factor XI o XIa se mezcla con adyuvante completo de Freund, el siguiente con adyuvante incompleto de Freund. Cuatro días después del refuerzo final, se extraen los bazo de los ratones inmunizados y los esplenocitos se fusionan con la línea celular de mieloma murino SP2/0-Ag14, según el procedimiento descrito por primera vez por (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; 256: 495-7), excepto que las células alimentadoras son reemplazadas por IL-6. Los ratones inmunizados se sacrifican y se extraen esplenocitos de los bazo, y se lavan en medio Eagles modificado de Dulbecco sin suero. De manera similar, las células de mieloma SP2/0-Ag14 se lavan y se agregan a los esplenocitos dando una proporción de 5: 1 de esplenocitos con respecto a células de mieloma. Las células forman entonces gránulos y se elimina el sobrenadante. Luego se agrega gota a gota un ml de una solución al 40

5 % (v/v) de polietilenglicol 1500 durante un período de 60 segundos, después de lo cual las células se incuban durante otros 60 segundos a 37 °C. Luego se añaden nueve ml de medio Eagle modificado de Dulbecco con agitación suave. Las células forman gránulos, se lavan para eliminar el polietilenglicol residual y finalmente se colocan en placas a una concentración de 10⁵ células por pocillo en medio Eagle modificado de Dulbecco que contiene un 10 % (v/v) de suero bovino fetal (100 µl por pocillo). Después de 24 horas, se añaden a cada pocillo 100 µl de una solución 2x de medio de selección de hipoxantina/azaserina. En el 4^o día, el medio de selección de hipoxantina/azaserina se repone, en el 7^o día se reemplaza por el medio Eagle modificado de Dulbecco que contiene un 10 % (v/v) de suero bovino fetal. Durante todas las incubaciones, la IL-6 humana recombinante o derivada de monocitos está presente en el cultivo en concentraciones de aproximadamente 10 pg/ml. Alrededor del 80 % de los pocillos muestran crecimiento celular el 10^o día.

Ejemplo 6: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la detección de anticuerpos contra el factor XI

15 [0131] Los pocillos se analizan en busca de la presencia de anticuerpos contra los factores XI o XIa utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, en el que se usan factores XI o XIa humanos purificados para el recubrimiento (2 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4 [PBS]; 100 µl/pozo). Los sitios de unión no específicos residuales se bloquean luego durante 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con PBS/0.1 % (p/v) Tween 20 (PBS-T) que contiene 0.2 % (p/v) de gelatina (PBS-TG). Entonces, después de un procedimiento de lavado (5 veces con PBS-T), las placas se incuban durante 60 minutos a 37 °C con 20 µl de sobrenadante de hibridoma junto con 80 µl de PBS-TG. Finalmente, los anticuerpos murinos unidos se detectan mediante incubación con anticuerpos de inmunoglobulina anti-ratón de cabra policlonales conjugados con peroxidasa durante 120 minutos a 37 °C. Finalmente, las placas se lavan con agua destilada (5 veces) y se revelan con 3,5,3',5'-tetrametil bencidina. Los anticuerpos antifactor XI obtenidos de esta manera se analizan más a fondo. Este ensayo se denomina ensayo 6 en la tabla 2, la notación es FXI/FXIa cuando un mAb se une al factor XI y al factor XIa al examinar en estos ELISA; FXI cuando solo se une al factor XI y no al factor XIa; y FXIa cuando el anticuerpo monoclonal solo se une al factor XIa y no al factor XI.

Ejemplo 7: Preparación del anticuerpo monoclonal purificado anti-factor XI

30 [0132] El anticuerpo se produce in vitro a partir de los hibridomas antifactor XI o XIa mediante el cultivo de células en botellas de rodillo de 1 litro en medio de Dulbecco modificado de Iscove suplementado con un 2 % (v/v) de suero bovino fetal, 10 pg/ml de IL-6, 2-mercaptoetanol 50 µM, y penicilina y estreptomycin. Las células crecen hasta una densidad de > 10⁶ células por ml, y una o dos semanas más tarde se recogen los sobrenadantes. Se agrega sulfato de amonio sólido para producir una saturación del 50 % (es decir, aproximadamente 2 M), y se obtiene una fracción enriquecida con anticuerpos mediante centrifugación durante 30 minutos a 1300 g. El precipitado se disuelve en NaCl 1.5 M/glicina 0.75 M, pH 8.9, y se coloca en una columna de proteína A-Sepharose (Pharmacia). La columna se lava con PBS, y entonces el anticuerpo monoclonal antifactor XI se eluye con glicina-HCl, pH 2.5. Las fracciones se neutralizan instantáneamente con TRIS 2M, pH 8.0, y las que contienen proteína se agrupan y se dializan contra PBS.

Ejemplo 8: Caracterización funcional de anticuerpos monoclonales antifactor XI o XIa

45 [0133] Los anticuerpos contra el factor XI se caracterizan probándolos en los ensayos descritos anteriormente. El resultado de estos experimentos es el que se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Ejemplos de caracterización de anticuerpos monoclonales contra el factor XI

mAb	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Interpretación
1*	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	FXI/FXIa	MAB se une a todas las formas de FXI; no es adecuado como inhibidor
2*	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	FXI	MAB se une a FXI nativo; no es adecuado como inhibidor
3*	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	FXIa	MAB se une a un neoepítipo en FXIa; no es adecuado como inhibidor
4	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	FXI/FXIa	MAB se une al sitio activo de FXI (a); inhibidor de FXI
5*	Sin efecto	Inhibe	Sin efecto	Inhibe	Sin efecto	FXI	MAB se une a FXI nativo cerca de Arg ₃₆₉ -Ile ₃₇₀ ; inhibidor de FXI
6*	Sin efecto	Sin efecto	Inhibe	Inhibe	Inhibe	FXI/FXIa	MAB se une al sitio de unión FIX de FXI; inhibidor
7*	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Inhibe	Inhibe	FXI/FXIa	MAB se une al sitio de unión HK de FXI; inhibidor potencial
8*	Sin efecto	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	FXIa	MAB se une al neoepítipo cerca del sitio activo; inhibidor

* mAb 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8 son ejemplos comparativos.

[0134] Para la aplicación como inhibidor, se seleccionan varios tipos de anticuerpos, a los que se hace referencia en la tabla como «inhibidor». Tenga en cuenta que esta tabla no está completa, se pueden encontrar otros patrones funcionales.

5

Ejemplo 9: Efectos del anticuerpo monoclonal antifactor XI sobre la trombosis experimental en un modelo de ratón

[0135] La eficacia del anticuerpo monoclonal antifactor XI para atenuar o prevenir la trombosis in vivo se estudia en el factor XI de ratones knock-out (D Gailani et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 1997; 8: 134-144), que se complementan con factor XI humano. Los animales se someten luego a formación de trombo experimental inducida por una lesión inducida por FeCl₃, por ejemplo como lo describen T Renné et al., J Exp Med 2005; 202: 271-281. En resumen, los ratones de 4-5 semanas de edad se anestesian con una inyección intraperitoneal de 2,2,2-tribromoetanol y 2-metil-2-butanol (0.15 ml/10 g de peso corporal en una solución al 2.5 %; Sigma-Aldrich). El factor XI humano (por ejemplo, 0.2 mg/kg) se inyecta a través de la vena de la cola, poco antes de comenzar el experimento. 10e8 plaquetas etiquetadas con CFSE por ratón se inyectan a través de la vena de la cola como una segunda inyección. El anticuerpo monoclonal contra el factor XI humano se administra a la vez, antes o después de la inyección del factor XI humano, en una dosis de 0.5-10 mg/kg. El mesenterio se exterioriza a través de una incisión abdominal por la línea media. Las arteriolas de 35-60 µm de diámetro se visualizan a 10x con un microscopio invertido (Axiovert 200; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) equipado con una lámpara fluorescente de 100 W (HBO) y una cámara CCD (CV-M300; Visitron Systems GmbH) conectado a un grabador de video S-VHS (AG-7355; Panasonic). Después de la aplicación tópica de un papel de filtro (2 x 1 mm) saturado con un 20 % de FeCl₃ durante 1 minuto, las arteriolas se monitorizan durante 40 minutos o hasta que se produce una oclusión completa (se detiene el flujo de sangre durante > 1 minuto). La adhesión plaquetaria se define como el número de plaquetas marcadas con fluorescencia unidas a la pared del vaso 5 minutos después de la lesión. Un trombo se definió como un agregado de plaquetas > 20 µm de diámetro. La eficacia del anticuerpo monoclonal para inhibir la formación de trombos se muestra comparando los resultados de ratones suplementados solo con factor XI humano (*formación de trombos; oclusión*), con factor humano XI y anticuerpo monoclonal antifactor XI (*no hay formación de trombo; sin oclusión*) o no suplementado en absoluto (*no hay formación de trombo; sin oclusión*), y ratones de tipo salvaje (*formación de trombos; oclusión*).

30

Ejemplo 10: Efectos del anticuerpo monoclonal antifactor XI en un modelo de primates para trombosis experimental

[0136] La eficacia del anticuerpo monoclonal antifactor XI para atenuar o prevenir la trombosis in vivo también se estudia en modelos de primates no humanos para la trombosis, por ejemplo, los modelos descritos por A Gruber et al. (Blood. 2003; 102: 953-955). En resumen, los babuinos son adecuadamente anestesiados y se les inyecta heparina porcina (1000 U/mL; Wyeth-Ayerst, Pearl River, NY) por vía intravenosa como control anticoagulante o anticuerpo monoclonal purificado por afinidad contra el factor XI en una dosis de 0.5-10 mg por kg. Además, algunos animales no reciben heparina o anticuerpo monoclonal antifactor XI. Los efectos antitrombóticos de la heparina o del anticuerpo monoclonal antifactor XI se estudian utilizando dispositivos trombogénicos desplegados durante 60 minutos en derivaciones arteriovenosas (AV) crónicas de flujo elevado colocadas quirúrgicamente. El dispositivo que se va a utilizar puede ser un segmento de injerto de dacrón de 20 mm de longitud (0.25 ml) y una cámara de extensión de silicona (1.3 ml), o segmentos de injerto de politetrafluoroetileno expandido anillado de 20 mm de longitud (0.25 ml) (ePTFE, teflón) (WL Gore, Newark, DE) en la derivación. El injerto de ePTFE hipotrombogénico se convierte en un dispositivo dependiente del factor tisular trombogénico agudo tal como lo describen Gruber et al. Antes del despliegue, el injerto se enjuaga pasando 50 ml de solución salina a través del lumen. El flujo sanguíneo se mantiene a 100 ml/min mediante pinzamiento proximal. La trombogénesis se evalúa midiendo los contenidos de fibrina y plaquetas radiomarcadas de los dispositivos trombogénicos. En resumen, el contenido de fibrina terminal de los trombos de injerto/cámara (deposición de fibrina) se determinó mediante recuento directo de fibrina marcada con yodo¹²⁵. El número de plaquetas depositadas en los segmentos de derivación de 35 cm de largo y 4 mm de diámetro interno que incorporan los dispositivos y los trombos asociados se cuantifica mediante generación de imágenes de plaquetas marcadas con indio¹¹¹ con períodos de adquisición de datos de 5 minutos. La tasa neta de acumulación de plaquetas (NPAR) se calcula como el cambio en el contenido de plaquetas del dispositivo durante un período.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

60 [0137]

<110> Prothix B.V.

<120> Uso de anticuerpos antifactor XI para la prevención de la formación de trombos

ES 2 702 365 T3

<130> P6022029PCT

<150> US 61/073,882

<151> 2008-06-19

<160> 1

5 <170> versión de PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 607

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 1

Glu Cys Val Thr Gln Leu Leu Lys Asp Thr Cys Phe Glu Gly Gly Asp
 1 5 10 15
 Ile Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser Ala Lys Tyr Cys Gln Val Val Cys
 20 25 30
 Thr Tyr His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Thr Phe Thr Ala Glu Ser Pro
 35 40 45
 Ser Glu Asp Pro Thr Arg Trp Phe Thr Cys Val Leu Lys Asp Ser Val
 50 55 60
 Thr Glu Thr Leu Pro Arg Val Asn Arg Thr Ala Ala Ile Ser Gly Tyr
 65 70 75 80
 Ser Phe Lys Gln Cys Ser His Gln Ile Ser Ala Cys Asn Lys Asp Ile
 85 90 95
 Tyr Val Asp Leu Asp Met Lys Gly Ile Asn Tyr Asn Ser Ser Val Ala
 100 105 110
 Lys Ser Ala Gln Glu Cys Gln Glu Arg Cys Thr Asp Asp Val His Cys
 115 120 125
 His Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Arg Gln Phe Pro Ser Leu Glu His Arg
 130 135 140
 Asn Ile Cys Leu Leu Lys His Thr Gln Thr Gly Thr Pro Thr Arg Ile
 145 150 155 160
 Thr Lys Leu Asp Lys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys Ser Cys Ala
 165 170 175
 Leu Ser Asn Leu Ala Cys Ile Arg Asp Ile Phe Pro Asn Thr Val Phe
 180 185 190

ES 2 702 365 T3

Ala Asp Ser Asn Ile Asp Ser Val Met Ala Pro Asp Ala Phe Val Cys
195 200 205

Gly Arg Ile Cys Thr His His Pro Gly Cys Leu Phe Phe Thr Phe Phe
210 215 220

Ser Gln Glu Trp Pro Lys Glu Ser Gln Arg Asn Leu Cys Leu Leu Lys
225 230 235 240

Thr Ser Glu Ser Gly Leu Pro Ser Thr Arg Ile Lys Lys Ser Lys Ala
245 250 255

Leu Ser Gly Phe Ser Leu Gln Ser Cys Arg His Ser Ile Pro Val Phe
260 265 270

Cys His Ser Ser Phe Tyr His Asp Thr Asp Phe Leu Gly Glu Glu Leu
275 280 285

Asp Ile Val Ala Ala Lys Ser His Glu Ala Cys Gln Lys Leu Cys Thr
290 295 300

Asn Ala Val Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Ala Ser
305 310 315 320

Cys Asn Glu Gly Lys Gly Lys Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Asn Gly
325 330 335

Ser Pro Thr Lys Ile Leu His Gly Arg Gly Gly Ile Ser Gly Tyr Thr
340 345 350

Leu Arg Leu Cys Lys Met Asp Asn Glu Cys Thr Thr Lys Ile Lys Pro
355 360 365

Arg Ile Val Gly Gly Thr Ala Ser Val Arg Gly Glu Trp Pro Trp Gln
370 375 380

Val Thr Leu His Thr Thr Ser Pro Thr Gln Arg His Leu Cys Gly Gly
385 390 395 400

Ser Ile Ile Gly Asn Gln Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Tyr
405 410 415

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

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

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

ES 2 702 365 T3

Leu Leu Lys Leu Glu Thr Thr Val Asn Tyr Thr Asp Ser Gln Arg Pro
 465 470 475 480
 Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Arg Asn Val Ile Tyr Thr Asp Cys
 485 490 495
 Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Lys Leu Arg Asp Lys Ile Gln Asn
 500 505 510
 Thr Leu Gln Lys Ala Lys Ile Pro Leu Val Thr Asn Glu Glu Cys Gln
 515 520 525
 Lys Arg Tyr Arg Gly His Lys Ile Thr His Lys Met Ile Cys Ala Gly
 530 535 540
 Tyr Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 545 550 555 560
 Leu Ser Cys Lys His Asn Glu Val Trp His Leu Val Gly Ile Thr Ser
 565 570 575
 Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Arg Glu Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn
 580 585 590
 Val Val Glu Tyr Val Asp Trp Ile Leu Glu Lys Thr Gln Ala Val
 595 600 605

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de unión que se une específicamente al factor XI, para usar en la prevención o el tratamiento de una trombosis patológica o en la prevención de la trombosis en un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar trombosis debido a un procedimiento médico, donde la molécula de unión se une al sitio activo ubicado en la región de la cadena ligera del factor XI e inhibe la actividad del factor XIa en el ensayo cromogénico para determinar la actividad del factor XIa en el que se utiliza L-piroglutamil-L-prolil-L-arginina-p-nitroanilida como sustrato cromogénico y en la que la molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión al factor XI.
- 10 2. Molécula de unión para su uso según la reivindicación 1, donde la molécula de unión se une preferentemente a la forma activada del factor XI.
- 15 3. Molécula de unión para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la molécula de unión se administra en una dosis equivalente a una dosis de 0.5 a 20 mg de IgG por kg de peso corporal.
- 20 4. Molécula de unión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la molécula de unión se administra en una dosis que produce una relación molar en suero que es igual o inferior a 4 moles de sitios de unión del factor XI de la molécula de unión con respecto a 1 mol del factor XI, donde los sitios de unión del factor XI de la molécula de unión tienen una Kd que es igual o inferior a 1 nM.
- 25 5. Molécula de unión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la trombosis patológica o el procedimiento médico que da como resultado un mayor riesgo de desarrollar trombosis es al menos un trastorno, una enfermedad o una afección seleccionados del grupo que consiste en infarto de miocardio, ictus isquémico, embolias cardiovasculares debidas a fibrilación auricular, trombosis de acceso vascular, trombosis venosa profunda, trombosis arterial, trombosis de la arteria coronaria, aterosclerosis, artritis, vasculitis, síndrome de dificultad respiratoria, cardiopatía isquémica, enfermedad isquémica cerebral, embolia pulmonar, embolia pulmonar venosa como resultado de cirugía o inmovilización, trombosis y oclusión de injertos sintéticos, stents o fistulas AV, válvulas cardíacas protésicas, coagulación intravascular difusa (CID), hemodiálisis, fibrilación auricular, sepsis, shock séptico, insuficiencia orgánica, insuficiencia renal, toxicidad inducida por administración de proteínas terapéuticas *in vivo*, traumatismo múltiple, lesiones por isquemia-reperusión, deposición local no deseada de fibrina y deposición de fibrina en los alvéolos pulmonares durante la dificultad respiratoria del adulto.
- 30 6. Molécula de unión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la molécula de unión se administra por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.
- 35 7. Molécula de unión para su uso según la reivindicación 6, donde la molécula de unión se administra por vía intravenosa como infusión en bolo o como infusión continua durante hasta 24 horas.
- 40 8. Molécula de unión para su uso según la reivindicación 5, donde el trastorno, enfermedad o afección es una trombosis y oclusión de injertos sintéticos, stents o fistula AV en un paciente renal que se somete a diálisis regular, donde la molécula de unión se administra al paciente en el fluido corporal dializado que se devuelve al paciente.
- 45 9. Molécula de unión para el uso según la reivindicación 5, donde el sujeto es un paciente con fibrilación auricular, angina de pecho inestable, tromboembolismo venoso, válvulas cardíacas protésicas, cardiopatía isquémica, enfermedad cerebral isquémica, injertos vasculares, coagulación intravascular difusa, sepsis, o un paciente sometido a cirugía de próstata u ortopédica en la que la molécula de unión se administra no más de una vez cada 2 semanas.
- 50 10. Molécula de unión para un uso según la reivindicación 9, donde la molécula de unión tiene una semivida de al menos 6 días y una Kd inferior a 1 nM.