

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 594**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2009 PCT/US2009/068768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10080623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09837993 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2373691**

54 Título: **Anticuerpos anti-fXI y métodos de uso**

30 Prioridad:

18.12.2008 US 138590 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2019

73 Titular/es:

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY (20.0%)
2525 SW First Avenue, Suite 120
Portland, OR 97201, US;
VANDERBILT UNIVERSITY (20.0%);
GRUBER, ANDRAS (20.0%);
TUCKER, ERIK I. (20.0%) y
GAILANI, DAVID (20.0%)**

72 Inventor/es:

**GRUBER, ANDRAS;
TUCKER, ERIK, I. y
GAILANI, DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 720 594 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-fXI y métodos de uso

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales específicos para el factor de coagulación XI (fXI) y sus métodos de uso.

10 **Antecedentes**

La trombosis es un término general para las enfermedades causadas por la acumulación localizada de elementos sanguíneos circulantes dentro de la vasculatura que da lugar a oclusión del vaso. Los fármacos antitrombóticos convencionales pueden inhibir el crecimiento del trombo al atacar las vías de coagulación (por ejemplo, heparina y warfarina) o mecanismos dependientes de plaquetas (como la aspirina o el clopidogrel). Los agentes trombolíticos (por ejemplo, la estreptoquinasa) se usan para degradar los trombos *in situ* para restaurar el flujo sanguíneo. A pesar de los avances en este campo, la búsqueda de nuevas estrategias continúa debido a que los tratamientos existentes alteran la hemostasia y deben administrarse en dosis que no logran la máxima eficacia (Gruber y Hanson, *Curr. Pharm. Des.* 9(28):2367-2374, 2003).

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

Los plasmas de mamíferos placentarios y marsupiales contienen factor XI (fXI) (Ponczek *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 6: 1876-1883, 2008), el zimógeno de una proteasa plasmática (fXIa) que contribuye a la formación y estabilidad de la fibrina a través de la activación del factor IX (Furie *et al.*, *Hematology: Basic Principles and Practice*, 4ª ed. Nueva York: Churchill Livingstone 1931, 2005). La deficiencia de fXI produce un trastorno hemorrágico inducido por traumatismos variables en seres humanos y otras especies (Seligsohn *et al.*, *Thromb. Haemost.* 98:84 -89, 2007; Knowler *et al.*, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205:1557 -61, 1994; Ghanem *et al.*, *J. Vet. Med. Sci.* 67: 713-715 (2005); Troxel *et al.*, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 38:549 -553, 2002). El mecanismo fisiológico mediante el cual se ha convertido el fXI en fXIa ha sido objeto de debate (Pedicord *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12855 -12860, 2007; Blat y Seiffert, *Thromb. Haemost.* 99:457 -460, 2008). Cuando la sangre se expone a una superficie cargada, el proceso de activación por contacto convierte el factor XII (fXII) en la proteasa fXIIa, que luego activa el fXI (Gailani y Broze, *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Scriver *et al.*, eds., Nueva York, NY: McGraw-Hill, páginas 4433-4453, 2001). La contribución de esta reacción a la hemostasia es incierta porque la deficiencia de fXII, a diferencia de la deficiencia de fXI, no está asociada a hemorragia anormal en ninguna especie en la que se ha identificado (Gailani and Broze, *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Scriver *et al.*, eds., Nueva York, NY: McGraw-Hill, páginas 4433-4453, 2001). Esta es una pieza clave de la evidencia de apoyo para las hipótesis que proponen que el fXI se activa durante la hemostasia por acción de una proteasa distinta de fXIIa, o que los mecanismos auxiliares para la activación de fXI pueden compensar la ausencia de fXIIa (Broze *et al.*, *Biochemistry* 29: 7539-7546, 1990; Davie *et al.*, *Biochemistry* 30:10363-10370, 1991; Renné *et al.*, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 5:733 -741, 2007).

Además del fXIIa, otros candidatos a activadores de fXI incluyen α -trombina (Naito *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:7353 -7358, 1991; Gailani *et al.*, *Science* 253:909-912, 1991), meizotrombina (von dem Borne *et al.*, *Thromb. Haemost.* 78: 834-839, 1997) y fXIa (autoactivación) (Naito *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:7353 -7358, 1991; Gailani *et al.*, *Science* 253:909-912 (1991). La trombina ha recibido mucha atención en este sentido. El trabajo de varios laboratorios apoya un modelo en el que la trombina u otra proteasa generada al principio de la coagulación activa el fXI (von dem Borne *et al.*, *Thromb. Haemost.* 78:834 -839, 1997; von dem Borne *et al.*, *Blood* 86:3035-3042, 1995; von dem Borne *et al.*, *J. Clin. Invest.* 99:2323 -2327, 1997; Cawthorn *et al.*, *Blood* 91:4581-4592, 1998; Keularts *et al.*, *Thromb. Haemost.* 85:1060 -1065, 2001; Oliver *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:170 -177, 1999; Wielders *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1138-1142, 2004), de modo que el fXIa mantiene la coagulación. Esta hipótesis ha sido cuestionada por un estudio que no encontró evidencia de activación de fXI en plasma estimulado por trombina o por factor tisular (TF) en ausencia de fXII (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12855 -12860, 2007). Este trabajo también mostró que el proceso de recolección y preparación de plasma puede generar fXIa, dando la falsa impresión en ensayos posteriores de que se ha producido activación de fXI independiente de fXIIa. Estas observaciones han sido presentadas en apoyo de una hipótesis, propuesta anteriormente por otros investigadores (Brunnée *et al.*, *Blood* 81:580-586, 1993), de que la hemostasia normal en la deficiencia de fXII refleja la pérdida de procesos iniciados por

fXIIa, tales como la fibrinólisis, que anula la propensión a sangrar por la pérdida simultánea de la activación del fXI (Pedicord *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12855 -12860, 2007; Blat *et al.*, *Thromb. Haemost.* 99:457 -460, 2008).

- 5 El factor de coagulación XII (fXII) se ha considerado durante mucho tiempo como un posible objetivo de la terapia antitrombótica segura. Sin embargo, todavía no se ha identificado un inhibidor lo suficientemente potente para la actividad del fXII, tal como un potente y útil anticuerpo. Anteriormente se ha descrito un inhibidor de fXIa de molécula pequeña; sin embargo, este inhibidor enzimático irreversible bloquea tanto el fXIa como la calicreína plasmática (Schumacher *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 570(1-3):167-174, 2007). Por lo tanto, existe la necesidad de un potente, inhibidor de fXI universal y específico.

Yamashita *et al.*, (2006) *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 1496-1501, desvelan el anticuerpo XI-5108 que inhibe la activación del factor XI a XIa.

15 Sumario

En el presente documento se describen anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que son específicos para el factor de coagulación XI (fXI) y reconocen universalmente al fXI de numerosas especies de mamíferos. Los anticuerpos desvelados evitan la activación de fXI por fXIIa, pero no interfieren con la activación de fXI mediada por la trombina o el factor tisular, lo cual es importante para el mantenimiento de la hemostasia.

La invención se define en la reivindicación 1 y las reivindicaciones dependientes. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el factor de coagulación XI (fXI) y que se une a fXI de manera competitiva con el anticuerpo que tiene la cadena ligera variable (V_L) de la SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada variable (V_H) de la SEQ ID NO: 3, en la que: la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo monoclonal comprende CDR1, CDR2 y CDR3 cada uno con los respectivos aminoácidos 24-34, 50-63 y 91-98 de la SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo monoclonal comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con los respectivos aminoácidos 31-35, 50-68 y 98-105 de la SEQ ID NO: 3.

30 En ejemplos específicos, los anticuerpos monoclonales incluyen una V_L con una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1 y una V_H con una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:3.

En el presente documento también se proporcionan inmunocombinados que comprenden los anticuerpos específicos de fXI y un compañero de fusión, tal como una molécula efectora, una etiqueta o un polipéptido heterólogo, así como composiciones que comprenden los anticuerpos e inmunocombinados. Además, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los anticuerpos e inmunocombinados desvelados en el presente documento, vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas y células huésped aisladas transducidas por los vectores.

Adicionalmente se desvela un método para inhibir la activación de fXI por fXIIa en un sujeto seleccionando un sujeto que necesita tratamiento y administrando al sujeto una cantidad inhibitoria de un anticuerpo específico para fXI desvelados en el presente documento, o un inmunocombinado o una composición del mismo. En algunos enfoques, el sujeto que necesita tratamiento es un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar trombosis, o es un sujeto con activación patológica de fXI.

45 Los anteriores y otros objetos, características, y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

50 Las **figuras 1A-1E** son gráficos que muestran el efecto de fXI en la generación de trombina en plasma deficiente en fXI. La generación de trombina en plasma se muestra como un área bajo la curva (AUC) para la figura 1A y la figura 1B o la generación de trombina en el tiempo para las figuras 1C-1E. La coagulación se inició con (A) Ca^{2+} y concentraciones variables de TF en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de fXI; (B) TF 0,23 pM y Ca^{2+} (barras blancas) o Ca^{2+} solo (barras negras) a concentraciones variables de fXI; (C) Ca^{2+} y 1,6 pM (curvas 1 y 2) o 0,23 pM (curvas 3 y 4) TF en presencia (curvas 1 y 3) o ausencia (curvas 2 y 4) de fXI; (D) Ca^{2+} y fXIa 30 pM (curvas 1 y 2) o 6 pM (curvas 3 y 4), en presencia (curvas 1 y 3) o ausencia (curvas 2 y 4) de fXI; o (E) α -trombina 5 nM en presencia (curva 1) o ausencia (curva 2) de fXIa.

60 Las **figuras 2A y 2B** son gráficos que muestran el efecto de fXI recombinante en la generación de trombina en plasma deficiente en fXI. Se muestra la generación de trombina en plasma deficiente en fXI con (A) fosfolípidos o (B) plaquetas purificadas en gel y fXI^{WT} recombinante (1), (2) vehículo, (3) fXI-Ala⁵⁵⁷ o (4) fXI-Ala¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

65 Las **figuras 3A-3C** son gráficos que muestran el efecto de fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴ recombinante sobre la generación de trombina en plasma deficiente en fXI. (A) Activación de fXI^{WT} 25 nM (cuadrados blancos y círculos blancos) o fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴ (cuadrados negros y círculos negros) por fXIIa 5 nM (cuadrados blancos y negros) o α -trombina 15 nM (círculos blancos y negros). La generación de fXIa se siguió de escisión de S2366. (B y C) Generación de trombina en plasma deficiente en fXI con (B) fosfolípidos o (C) plaquetas purificadas en gel y fXI^{WT} recombinante (1), (2) vehículo o (3) fXI-Ala⁸³⁻⁸³.

Las **figuras 4A y 4B** son gráficos que muestran el efecto de fXIa sobre la generación de trombina en plasma deficiente en fXI. Se muestra la generación de trombina en plasma deficiente en fXI suplementado con (A) vehículo o (B) fXI 30 nM. La coagulación se inició con (1) fXIa 300, (2) 30, (3) 3,0 o (4) 0,3 pM.

Las **figuras 5A-5C** son inmunotransferencias que utilizan anticuerpos monoclonales anti-factor XI y una gráfica que muestra el efecto de los anticuerpos fXI sobre la activación de fXI. Transferencias Western de fXI recombinante y PK utilizando (A) IgG O1A6 anti-fXI humano o (B) IgG 14E11 anti-fXI murino como anticuerpo primario. Las abreviaturas en la parte superior de las transferencias indican fXI (H) humano; fXI murino (M); fXI humano con los dominios A1, A2, A3 o A4 de la precalicreína humana; y precalicreína humana (PK). Obsérvese que fXI / PKA4 es aproximadamente la mitad de la masa molecular de otras especies de fXI. Esto se debe a que el dominio A4 de PK no puede mediar en la formación de dímeros. Las posiciones de los patrones de masa molecular se siembran a la izquierda del panel A. (C) Activación de fXI 25 nM con fXIIa 5 nM (círculos blancos y negros) o α -trombina 15 nM (cuadrados y triángulos blancos) en presencia (círculos negros y triángulos blancos) o ausencia (círculos y cuadrados blancos) de IgG 14E11 100 nM. La generación de fXI se siguió de escisión de S2366.

Las **figuras 6A-6C** son gráficos que muestran el efecto de la IgG O1A6 anti-fXI sobre la generación de trombina en plasma deficiente en fXII. Se muestra la generación de trombina en plasma deficiente en fXII en el que se inició la coagulación mediante la adición de Ca^{2+} y (A) TF 0,23 pM, (B) α -trombina 5 nM o (C) α -trombina 10 nM en ausencia (curvas marcadas con 1) o presencia (curvas marcadas con 2) de IgG O1A6 anti-fXI humano 50 nM.

Las **figuras 7A y 7B** son gráficos que muestran los efectos de IgG O1A6 y 14E11 anti-fXI sobre la generación de trombina en plasma deficiente en fXII inducido a coagular con α -trombina o fXIIa. (A) Generación de trombina en plasma deficiente en fXII inducida a coagular con Ca^{2+} y α -trombina 5 nM (curvas 1-3) o vehículo (curva 4). La generación de trombina en la curva 2 está en presencia de IgG O1A6 anti-fXI 50 nM y la curva 3 en presencia de anti-fXI 14E11 50 nM. (B) Generación de trombina en plasma deficiente en fXII inducida a coagular con Ca^{2+} y fXIIa 1 nM en presencia de (1) vehículo, (2) 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de CTI o (3) IgG 14E11 anti-fXI 50 nM.

La **figura 8** es un esquema que representa las cascadas de generación de trombina hemostática y trombótica. El anticuerpo monoclonal 14E11 bloquea la activación de fXI por fXIIa.

La **figura 9** muestra una inmunotransferencia de fXI inmunoprecipitado de plasma recolectado de diversas especies de mamíferos y una especie aviar (pollo). Se obtuvo plasma o suero de las especies indicadas y se inmunoprecipitó con 14E11. El eluato se separó en geles de poliacrilamida-SDS y se sometió a inmunotransferencia con 14E11 biotinilado, seguido de estreptavidina-HRP.

Las **figuras 10A y 10B** son inmunotransferencias de proteínas fXI recombinantes. (A) Se generaron proteínas quiméricas en las que los cuatro dominios manzanas fXI individuales (A1-A4) se intercambiaron con el dominio correspondiente de precalicreína (PK).

Las proteínas quiméricas se separaron por electroforesis y se sometieron a inmunotransferencia con 14E11. (B) Se generaron proteínas de fusión en las que cada dominio manzana individual de fXI se fusionó con el activador del plasminógeno tisular (tPA). Las proteínas de fusión se separaron por electroforesis y se sometieron a inmunotransferencia con 14E11.

Listado de secuencias

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras estándar para las bases nucleotídicas y un código de tres letras para aminoácidos, tal como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida en cualquier referencia a la cadena mostrada. en el listado de secuencias adjunto:

La **SEQ ID NO:1** es la secuencia de aminoácidos de la V_L de 14E11.

La **SEQ ID NO: 2** es la secuencia de nucleótidos de la V_L de 14E11 (y codifica la SEQ ID NO:1).

La **SEQ ID NO:3** es la secuencia de aminoácidos de la V_H de 14E11.

La **SEQ ID NO: 4** es la secuencia de nucleótidos de la V_H de 14E11 (y codifica la SEQ ID NO: 3).

Descripción detallada

1. Introducción

El factor de coagulación XII (fXII) se ha considerado recientemente como un posible objetivo de la terapia antitrombótica segura (Renné *et al.*, *J Exp Med.* 202(2):271-81, 2005; Kleinschnitz *et al.*, *J Exp Med.* 203(3):513-8, 2006). Sin embargo, todavía no se ha identificado un inhibidor lo suficientemente potente para la actividad del fXII, tal como un potente y útil anticuerpo. Una de las posibles razones del fracaso es que el fXII es una proteína abundante en la sangre y, cuando se activa, se convierte en una enzima muy activa que es difícil de bloquear *in vivo*.

En el presente documento se desvela la identificación de un anticuerpo que se dirige al sustrato procoagulante de fXII activado (fXIIa). La orientación del sustrato en lugar de la enzima es beneficiosa porque la concentración del sustrato coagulante, el factor XI (fXI), es significativamente menor que la concentración de fXII. Por otra parte, es útil apuntar al sustrato (fXI) en lugar de a la enzima (fXIIa), debido a que este enfoque proporciona una especificidad de tratamiento sin precedentes y deja otras, actividades biológicas potencialmente beneficiosas de fXIIa, tal como la

activación de precalicreína (y, por lo tanto, la producción de bradiquinina), intactas. La orientación del sustrato da como resultado el efecto farmacodinámico muy específico de la actividad anticoagulante exclusiva, por inhibición de la actividad procoagulante del complejo de activación por contacto y, por lo tanto, de la cascada de coagulación intrínseca.

- 5 Se cree que el factor de coagulación XI contribuye a la trombosis, una afección patológica que, dependiendo de su localización anatómica, da como resultado enfermedades de alta mortalidad, incluyendo las principales causas de muerte (como el infarto de miocardio, ictus isquémico, tromboembolia pulmonar, coagulación intravascular diseminada (CID) y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica grave (SSIRS) en infecciones y otras afecciones). El fXI es una proenzima (cimógeno) que puede ser activada por al menos otras tres enzimas, el factor XIIa (fXIIa), la trombina (fIIa) y el factor XIa (fXIa). El factor XI activado (fXIa) activa a continuación el factor IX (fIX) y, finalmente, amplifica la generación de trombina.

- 15 En el presente documento se desvela la identificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal (14E11) específico para fXI. 14E11 es un anticuerpo monoclonal IgG2 murino que se une al dominio A2 de fXI e inhibe su activación por fXIIa. El anticuerpo no bloquea la activación de fXI por la trombina o el factor tisular, ni la activación de precalicreína por fXIIa, ni bloquea la actividad de fXIa. Los hallazgos desvelados en el presente documento indican que es posible apuntar a la activación mediada por fXIIa de fXI, que promueve el crecimiento del trombo, sin interferir con la activación de fXI mediada por trombina que es importante para la hemostasia.

- 20 En particular, en el presente documento se describe el descubrimiento de que 14E11 prolonga el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) de todos los plasmas de mamífero analizados, incluyendo ratón, ser humano, babuino y otros. Esto ilustra que 14E11 (y sus fragmentos de unión, así como los anticuerpos monoclonales que se unen competitivamente con 14E11) son potentes agentes antitrombóticos. Además, los estudios descritos en el presente documento revelan que 14E11 es antitrombótico en un modelo de ratón de trombosis arterial aguda y que inhibe la formación de trombos en un modelo de trombosis de primates.

- 30 En consecuencia, los anticuerpos específicos de fXI de la presente divulgación son seguros para el tratamiento de enfermedades trombóticas en las que la activación de fXI por fXIIa tiene un papel patogénico. Dado que la activación de fXI hemostático y las actividades beneficiosas de FXIIa no se ven afectadas por este anticuerpo, este anticuerpo representa un anticoagulante monoespecífico que no tiene ningún efecto secundario hemorrágico (alteración de la hemostasia) u otro efecto secundario dependiente de FXIIa. Por lo tanto, es diferente de otros inhibidores de fXI que bloquean tanto el efecto protrombótico (efecto negativo, perjudicial) como el prohemostático (efecto positivo, beneficioso) de fXI. También es diferente de los inhibidores directos de FXIIa que bloquean las actividades tanto beneficiosas (fisiológicas) como perjudiciales (patológicas) de FXIIa.

35 *II. Abreviaturas*

APTT	Tiempo de tromboplastina parcial activada
AUC	Área bajo la curva
ASC	Seroalbúmina bovina
CAT	Trombografía automatizada calibrada
CTI	Inhibidor de la tripsina del maíz
DFP	Diisopropilfluorofosfato
CID	Coagulación intravascular diseminada
ETP	Potencial endógeno de la trombina
fIX	Factor IX
fXI	Factor XI
fXIa	Factor activado XI
fXII	Factor XII
fXIIa	Factor XII activado
CI	Concentración inhibitoria
Ig	Inmunoglobulina
PK	Precalicroeína
PRP	Plasma rico en plaquetas
PTT	Tiempo de tromboplastina parcial
RBC	Cefalina de cerebro de conejo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SSIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica grave
TF	Factor tisular
tPA	Activador del plasminógeno tisular

V _H	Cadena pesada variable
V _L	Cadena ligera variable

III. Términos y métodos

5 A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con su uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes sobre biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.*, (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

10 Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Administración: La introducción de una composición en un sujeto por una vía elegida. Por ejemplo, si la vía elegida es intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición en una vena del sujeto.

15 **Animal:** Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, cualquier mamífero. El término mamífero incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma análoga, El término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.

20 **Anticuerpo:** Un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno, tal como fXI o un fragmento del mismo. Los anticuerpos están compuestos por una cadena pesada y una ligera, cada una de los cuales tiene una región variable, denominada la región variable pesada (V_H) y la región variable ligera (V_L). Conjuntamente, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión al antígeno reconocido por en anticuerpo.

25 Los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de anticuerpos bien conocidos en la técnica, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv de cadena sencilla ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlazador, mientras que en dsFvs, las cadenas han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology*, 3ª Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

35 Por lo general, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

40 Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). En combinación, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Se ha definido la extensión de la región marco y las CDR (véase, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat e encuentra ahora online. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, tales como los seres humanos. La región marco de un anticuerpo, que es las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

50 Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y también se identifican normalmente por la cadena en la que está ubicada la CDR particular. Por lo tanto, una CDR3 de V_H está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Un anticuerpo que se une a fXI tendrá una región V_H específica y la secuencia de la región V_L y, por lo tanto, secuencias de CDR específicas. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente involucradas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos que determinan la especificidad (SDR).

Las referencias a "V_H" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "V_L" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de

inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectedo los genes de las cadenas ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, haciendo células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunes. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados. Como se usa en el presente documento, "anticuerpos monoclonales" incluye además fragmentos de unión a antígeno, tales como fragmentos Fv, scFv, dsfv o fab.

Un "anticuerpo quimérico" tiene restos marco de una especie, tales como de seres humanos y CDR (que generalmente confieren unión a antígeno) de otras especies, tales como un anticuerpo murino que se une específicamente a fXI.

Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, de rata, o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "acceptora". En una realización, todas las CDR provienen de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90 %, tal como aproximadamente un 95 % o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada de inmunoglobulina. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras adicionales que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas humanizadas se pueden construir por medio de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.585.089).

Un anticuerpo "humano" (también llamado anticuerpo "completamente humano") es un anticuerpo que incluye regiones marco humanas y todas las CDR de una inmunoglobulina humana. En un ejemplo, el marco y las CDR proceden de la misma secuencia de aminoácidos de cadena pesada y / o ligera de origen humano. Sin embargo, las regiones marco de un anticuerpo humano pueden diseñarse para incluir CDR de un anticuerpo humano diferente. Todas las partes de una inmunoglobulina humana son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural.

Anticoagulante: Un compuesto (tal como un agente farmacéutico o molécula) que previene o inhibe la coagulación de la sangre. Los anticoagulantes farmacéuticos pueden usarse para tratar trastornos trombóticos, tales como trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio y apoplejía.

Fragmento de unión a antígeno: Como se usa en el presente documento, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal es una porción de un anticuerpo monoclonal que conserva su capacidad para unirse específicamente al antígeno contra el cual se generó el anticuerpo monoclonal. Los fragmentos de unión a antígeno incluyen, aunque sin limitaciones, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, proteínas Fv de cadena sencilla y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro.

Antitrombótico: Cualquier compuesto (tal como un agente farmacéutico o molécula) que prevenga o inhiba la formación de un trombo. Los agentes antitrombóticos incluyen anticoagulantes (que limitan la capacidad de las plaquetas para coagular), fármacos antiplaquetarios (que limitan la migración y agregación de plaquetas) y fármacos trombolíticos (que disuelven los coágulos después de formarse).

Afinidad de unión: Afinidad de un anticuerpo por un antígeno. En un enfoque, la afinidad se calcula mediante una modificación del método de Scatchard descrito por Frankel *et al.* (*Mol. Immunol.*, 16:101 -106, 1979). En otro enfoque, la afinidad de unión se mide por una tasa de disociación antígeno / anticuerpo. En otro enfoque, una alta afinidad de unión se mide mediante un radioinmunoensayo de competición. En otro enfoque, la afinidad de unión se mide mediante ELISA.

Trastorno hemorrágico: Se refiere a cualquier defecto congénito, adquirido o inducido que da como resultado un sangrado anormal (o patológico). Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos de coagulación o hemostasia insuficiente, tal como hemofilia A (una deficiencia en el Factor VIII), hemofilia B (una deficiencia en el Factor IX), hemofilia C (una deficiencia en el factor XI), deficiencias de otros factores de coagulación (tal como el factor VII o el factor XIII), niveles anormales de inhibidores del factor de coagulación, trastornos plaquetarios, trombocitopenia, deficiencia de vitamina K y la enfermedad de von Willebrand.

Coagulación: El proceso de polimerización de monómeros de fibrina, que da como resultado la transformación de sangre o plasma de una fase líquida a una de gel. La coagulación de la sangre líquida puede producirse *in vitro*, intravascularmente o en una superficie del tejido expuesta y dañada. La coagulación sanguínea *in vitro* da como resultado una sangre gelificada que mantiene los componentes celulares y otros componentes de la sangre en esencialmente las mismas proporciones relativas que se encuentran en la sangre no coagulada, excepto por una reducción en el contenido de fibrinógeno y un aumento correspondiente en la fibrina.

Inhibidor competitivo: Cualquier molécula que se complete con otra molécula para unirse a un sustrato (tal como un antígeno). Los métodos para identificar moléculas que son inhibidores competitivos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, ensayos de unión competitiva).

Variantes conservadoras: Las sustituciones de aminoácidos "conservadoras" son las sustituciones que no afectan ni disminuyen sustancialmente la afinidad de un anticuerpo por el fXI. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a fXI puede incluir, como máximo, aproximadamente 1, como máximo aproximadamente 2, como máximo aproximadamente 5 y, como máximo, aproximadamente 10 o, como máximo aproximadamente 15 sustituciones conservadoras y se unen específicamente al polipéptido fXI. El término variación conservadora también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido, siempre que el anticuerpo se una específicamente a fXI. Las sustituciones no conservadoras son aquellas que reducen una actividad o unión a fXI.

Los expertos en la técnica conocen bien las tablas de sustitución de aminoácidos conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Región determinante de la complementariedad (CDR): Secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de Ig nativa. Las cadenas ligeras y pesadas de una Ig tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 e H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente.

Poner en contacto: Colocación en asociación física directa; incluye tanto en forma sólida como líquida.

Dominio: Una estructura de proteína que conserva su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En algunos casos, los dominios tienen propiedades funcionales discretas y se pueden añadir, eliminar o transferir a otra proteína sin pérdida de función.

Molécula efectora (ME): La porción de una molécula quimérica que se entiende que tiene un efecto deseado en una célula o sistema o sustancia a la que se dirige la molécula quimérica. El término molécula efectora es intercambiable con el resto efector, agente terapéutico, agente de diagnóstico, y términos similares.

Los agentes terapéuticos incluyen compuestos tales como ácidos nucleicos, proteínas (incluidos anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales), péptidos, aminoácidos o derivados, glucoproteínas, radioisótopos, lípidos, hidratos de carbono, virus recombinantes o toxinas. Los restos terapéuticos y de diagnóstico de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivados para la reticulación covalente con ADN simple o dúplex, y oligonucleótidos que forman triplex. Los agentes o restos de diagnóstico incluyen radioisótopos y otros marcadores detectables. Las etiquetas detectables útiles para tales fines también son bien conocidas en la técnica e incluyen isótopos radiactivos, tales como ³²P, ¹²⁵I, y ¹³¹I, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y enzimas.

Epítipo: Un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas en una molécula que son antigénicas, es decir, que provocan una respuesta inmune celular específica. Un anticuerpo se une específicamente a un epítipo antigénico particular en un polipéptido, tales como fXI.

Factor XI (fXI): fXI es la forma cimógena del factor XI activado (fXIa), una enzima implicada en la coagulación. Esta proteína se encuentra solo en los mamíferos. El fXI es activado por el fXIa, la trombina y mediante un mecanismo autocatalítico (véase la figura 8). El fXI se sintetiza como una sola cadena polipeptídica, pero circula como un homodímero formado por enlaces disulfuro. Cada cadena polipeptídica de fXI es de aproximadamente 80 kD. Durante la activación del factor XI, un enlace peptídico interno es escindido por el factor XIIa en cada una de las dos cadenas, y da como resultado el factor XIa activado, una serina proteasa compuesta por dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas por enlaces disulfuro. El factor XI activado desencadena la fase media de la vía intrínseca de la

coagulación sanguínea activando el factor IX. Los defectos en este factor conducen al síndrome de Rosenthal (también conocido como hemofilia C), una anomalía de la coagulación sanguínea. La proteína fXI está codificada por el gen F11. El fXI también se conoce como factor de coagulación XI o antecedente de tromboplastina plasmática. Como se usa en el presente documento, "factor de coagulación XI", "factor XI" o "fXI" se refiere a cualquier fXI de cualquier especie de mamífero que exprese la proteína. Por ejemplo, el fXI puede ser humano, de primate no humano (tal como babuino), ratón, perro, gato, una vaca, un caballo, cerdo, conejo, mapache, tigre, oso hormiguero, elefante (tal como elefante africano o elefante asiático) o llama.

Región marco: Secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR (o regiones hipervariables). Las regiones marco incluyen regiones marco ligeras variables o pesadas variables. Cada dominio variable comprende cuatro regiones marco, a menudo denominado FR1, FR2, FR3 y FR4. Las regiones marco sirven para mantener las CDR en una orientación apropiada para la unión al antígeno. Las regiones marco normalmente forman estructuras en lámina β .

Compañero de fusión: Se refiere a cualquier molécula que está fusionada (tal como unida covalentemente) a otra molécula. En el contexto de la presente divulgación, un inmunoconjugado incluye un anticuerpo unido a un compañero de fusión. En algunos ejemplos, el compañero de fusión es una molécula efectora, una etiqueta (tal como una etiqueta detectable), un polipéptido heterólogo o un fármaco.

Hemostasia: Se refiere al proceso fisiológico por el cual se detiene el sangrado. Los agentes hemostáticos son los que previenen, tratan o mejoran el sangrado anormal, tal como el sangrado anormal causado por un trastorno hemorrágico o un episodio de sangrado. Los trastornos de la hemostasia incluyen, por ejemplo, trastornos plaquetarios, tal como púrpura trombocitopénica idiopática y trastornos de la coagulación, tal como hemofilia. La hemostasia también puede referirse a la interacción compleja entre vasos, plaquetas, factores de coagulación, inhibidores de la coagulación y proteínas fibrinolíticas para mantener la sangre dentro del compartimiento vascular en un estado fluido. El objetivo del sistema hemostático es preservar la integridad intravascular logrando un equilibrio entre la hemorragia y la trombosis. Como se usa en el presente documento, "promover la hemostasia" se refiere al proceso de contribuir o mejorar la hemostasia en un sujeto. Por ejemplo, un agente que promueve la hemostasia puede ser un agente que reduce el sangrado anormal, tal como deteniendo el sangrado más rápidamente o reduciendo la cantidad de pérdida de sangre.

Heterólogo: Un polipéptido o polinucleótido heterólogo se refiere a un polipéptido o polinucleótido derivado de una fuente o especie diferente. Por ejemplo, un inmunoconjugado que comprende un polipéptido heterólogo se refiere a una proteína de fusión en la que un anticuerpo (o una porción de un anticuerpo) está unida a un polipéptido diferente, tal como una proteína marcadora.

Inmunoconjugado: Un enlace covalente de un compañero de fusión, tal como una molécula efectora, una etiqueta, un polipéptido heterólogo u otro resto, a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes, por ejemplo. En algunos casos, la unión es química, en la que una reacción entre el resto de anticuerpo y el compañero de fusión ha producido un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula. Un enlazador peptídico (secuencia peptídica corta) puede incluirse opcionalmente entre el anticuerpo y la molécula efectora.

Cantidad inhibitoria o dosis inhibitoria: Se refiere a la cantidad de una sustancia específica suficiente para lograr la inhibición de la actividad de una molécula particular o la inhibición de la activación de una molécula particular. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad necesaria para inhibir la activación de fXI en un sujeto o una muestra (tal como una muestra de plasma o suero). En algunas realizaciones, la cantidad inhibitoria de un anticuerpo monoclonal específico para fXI o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es la cantidad necesaria para inhibir la activación de fXI en al menos un 50 %. En algunos ejemplos, la cantidad de inhibidor es la cantidad necesaria para inhibir la activación de fXI en un 90-100 %.

Aislado: Un componente biológico "aislado", tal como un ácido nucleico, proteínas (incluidos los anticuerpos) u orgánulos, se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en el medio ambiente (tal como una célula) en el que el componente está de forma natural, es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Etiqueta: Un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con otra molécula, tal como un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de esa molécula. Ejemplos específicos no limitativos de etiquetas incluyen marcadores fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos. En un ejemplo, un "anticuerpo marcado" se refiere a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. Por ejemplo, la etiqueta es un marcador detectable, tal como la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos biotinilo que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En la técnica se conocen varios procedimientos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y se pueden usar. Ejemplos de

marcadores para polipéptidos incluyen, aunque no de forma limitativa, los siguientes: radioisótopos o radionucleótidos (tal como ³⁵S o ¹³¹I), etiquetas fluorescentes (tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, lantánidos fosforados), etiquetas enzimáticas (tales como peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (tal como las secuencias de un par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítomo), o agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. En algunos enfoques, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Enlazador: "Enlazador" en algunos enfoques se refiere a un péptido que sirve para enlazar un grupo objetivo, tal como un anticuerpo, a un compañero de unión, tal como una etiqueta detectable o polipéptido heterólogo. En algunos casos, un enlazador es un péptido dentro de un fragmento de unión a anticuerpo (tal como un fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable.

Los términos "conjugar", "unir", "conectar" o "enlazar" se refiere a convertir dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua, o a unir covalentemente un radionúclido u otra molécula a un polipéptido, tal como un scFv. En el contexto específico, los términos incluyen la referencia a unir un ligando, tal como un resto de anticuerpo, a un compañero de fusión. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción entre el resto del anticuerpo y el compañero de fusión, de manera que se forma un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

Mamífero: Este término incluye tanto a los mamíferos humanos como a los no humanos. De forma análoga, El término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.

Unido operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está operablemente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada en relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor, tal como el promotor de CMV, está operativamente unido a una secuencia de codificación si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, en el mismo marco de lectura.

ORF (marco de lectura abierto): Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación. Estas secuencias son generalmente traducibles en un péptido.

Parenteral: Se refiere a la administración que no sea a través del canal alimentario (el tracto digestivo), tal como mediante inyección subcutánea, intramuscular, administración intraesternal o intravenosa.

Activación patológica: Como se usa en el presente documento, "activación patológica de fXI" se refiere a la activación no deseada o anormal de fXI que puede producir efectos dañinos (tal como la promoción de la trombosis) en un sujeto que muestra dicha activación patológica.

Agente farmacéutico: Un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto o una célula.

Portadores farmacéuticamente aceptables: Los portadores farmacéuticamente aceptables para su uso son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, por E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición, 1975, describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los anticuerpos desvelados en el presente documento.

En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales generalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, tal como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para las composiciones sólidas (tal como polvo, píldora, comprimidos o cápsulas), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, o estearato de magnesio. Además de portadores biológicamente neutrales, composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener menores cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad: "Prevenir" una enfermedad se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad. "Tratar" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que ha comenzado a desarrollarse. "Mejorar" se refiere a la reducción en el número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad, tal como cáncer.

Promotor: Un promotor es una matriz de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, por ejemplo, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también

incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden localizarse a varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter *et al.*, *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987).

5 **Purificado:** El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación peptídica purificada es aquella en la que el péptido o la proteína está más enriquecido que el péptido o la proteína en su entorno natural dentro de una célula. Una preparación puede purificarse de modo que la proteína o el péptido represente al menos el 50 %, tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 %, del contenido total de péptidos o proteínas de la preparación.

10 **Recombinante:** Un ácido nucleico recombinante es uno que tiene una secuencia que no es natural o tiene una secuencia que está formada por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial se logra a menudo por síntesis química o, más habitualmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

15 **Identidad de secuencia:** La similitud entre las secuencias de aminoácidos se expresa en términos de la similitud entre las secuencias, de lo contrario se denomina identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide frecuentemente en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de un polipéptido poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia cuando se alinean utilizando métodos estándar.

20 Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet y col., *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988. Altschul *et al.*, *Nature Genet.* 6:119, 1994, presenta una consideración detallada de métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología.

25 La Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403, 1990) está disponible de varias fuentes, incluido el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en internet, para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencias de blastp, blastn, blastx, blastn y tblastx. En el sitio web del NCBI en internet se dispone de una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa.

30 Los homólogos y variantes de una V_L o una V_H de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido fXI se caracterizan normalmente por la posesión de al menos aproximadamente el 75 %, por ejemplo al menos el 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia contada sobre la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo usando el NCBI Blast 2.0, blastp con huecos configurado con parámetros por defecto. Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, la función de las secuencias de Blast 2 se emplea utilizando el conjunto de matriz BLOSUM62 predeterminado para los parámetros predeterminados (coste de existencia de hueco de 11 y un coste de hueco por residuo de 1). Al alinear péptidos cortos (menos de aproximadamente 30 aminoácidos), la alineación debe realizarse utilizando la función de secuencias Blast 2, empleando el conjunto de matriz PAM30 a los parámetros predeterminados (hueco abierto 9, penalizaciones por extensión de hueco 1). Las proteínas con aún mayor similitud con las secuencias de referencia mostrarán porcentajes cada vez mayores de identidades cuando se evalúen con este método, tal como al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia. Cuando se compara menos de la secuencia completa para la identidad de secuencia, los homólogos y las variantes normalmente poseerán al menos el 80 % de identidad de secuencia en ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos el 85 % o al menos el 90 % o el 95 % dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de la secuencia en esas ventanas cortas están disponibles en el sitio web del NCBI en Internet. Un experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solo como guía; es totalmente posible que se puedan obtener homólogos altamente significativos que caigan fuera de los intervalos provistos.

35 **Agente de unión específico:** Un agente que se une sustancialmente solo a un objetivo definido. Por lo tanto, un agente de unión específico a fXI es un agente que se une sustancialmente a un polipéptido fXI, pero no a otras moléculas.

40 La expresión "se une específicamente" se refiere, con respecto a un antígeno tal como fXI, a la asociación preferente de un anticuerpo u otro ligando, completo o en parte, a una célula o un tejido portadores de dicho antígeno y no a células o tejidos que carecen de ese antígeno. Se reconoce que puede ocurrir un cierto grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no objetivo. No obstante, la unión específica puede distinguirse como mediada a través del reconocimiento específico del antígeno. Aunque los anticuerpos selectivamente reactivos se unen al antígeno, pueden hacerlo con baja afinidad. Por otro lado, la unión específica da como resultado una

asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo (u otro ligando) y las células portadoras del antígeno que entre el anticuerpo unido (u otro ligando) y las células que carecen del antígeno. La unión específica generalmente da como resultado más de 2 veces, tal como más de 5 veces, más de 10 veces o más de 100 veces la cantidad de anticuerpo unido u otro ligando (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que porta el polipéptido fXI en comparación con una célula o tejido que carece del polipéptido. La unión específica a una proteína en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína en particular. Diversos formatos de inmunoensayos son apropiados para seleccionar anticuerpos u otros ligandos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de los formatos y condiciones del inmunoensayo que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Sujeto: Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye sujetos tanto humanos como veterinarios, incluidos mamíferos humanos y no humanos. En algunas realizaciones, un sujeto es cualquier mamífero, tal como un ser humano, primate no humano o sujeto veterinario, tal como un perro.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de una sustancia específica suficiente para lograr el efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad necesaria para inhibir la activación de fXI. Cuando se administran a un sujeto, generalmente se usará una dosis que logrará concentraciones tisulares diana que se ha demostrado que logran un efecto *in vitro* deseado.

Trombosis: La formación o presencia de un coágulo (también llamado "trombo") dentro de un vaso sanguíneo, que obstruye el flujo sanguíneo a través del sistema circulatorio. La trombosis generalmente es causada por anomalías en la composición de la sangre, la calidad de la pared del vaso y / o la naturaleza del flujo sanguíneo. La formación de un coágulo a menudo es causada por una lesión en la pared del vaso (como un traumatismo o infección) y por la ralentización o el estancamiento del flujo sanguíneo más allá del punto de la lesión. En algunos casos, las anomalías en la coagulación causan trombosis.

Transducido: Una célula transducida es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Como se usa en el presente documento, el término transducción abarca todas las técnicas mediante las cuales se podría introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo la transfección con vectores virales, transformación con vectores plasmídicos e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección, y aceleración de pistola de partículas.

Vector: Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula huésped, que produce de este modo una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tales como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la materia.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. Los términos en singular "un", "una", "uno", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De forma análoga, la palabra "o" pretende incluir la palabra "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente descripción, se describen a continuación los métodos y materiales adecuados.

IV. Anticuerpos monoclonales específicos para el factor XI

En el presente documento se describen anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son específicos para el factor de coagulación XI (fXI) y reconocen universalmente el fXI de numerosas y diversas especies de mamíferos. Los anticuerpos desvelados evitan la activación de fXI por fXIa, pero no interfieren significativamente con la activación de fXI mediada por la trombina o el factor tisular, lo cual es importante para el mantenimiento de la homeostasia. Como resultado, los anticuerpos desvelados son útiles para inhibir la trombosis sin alterar significativamente la homeostasia. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos monoclonales anti-fXI desvelados son capaces de unirse a fXI de varias especies de mamíferos diferentes, incluyendo, aunque no de forma limitativa, ser humano, ratón, babuino, oso hormiguero, una vaca, un caballo, cerdo, conejo, mapache, tigre, gato, perro, elefante africano y llama.

Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a fXI y evitan la activación de fXI por fXIa. La V_L del anticuerpo o fragmento comprende los aminoácidos 24-34 (CDR1), 50-63 (CDR2) y 91-98 (CDR3) de la SEQ ID NO: 1 y la V_H del anticuerpo o fragmento comprende los aminoácidos 31-35 (CDR1), 50-68 (CDR2) y 98-105 (CDR3) de

la SEQ ID NO:3.

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la V_L es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la V_L comprende la SEQ ID NO: 1 o consiste en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la V_H es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la V_H comprende la SEQ ID NO: 3 o consiste en la SEQ ID NO: 3.

En ejemplos particulares, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una V_L con una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1 y una V_H con una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:3.

Los anticuerpos específicos de fXI desvelados pueden ser, por ejemplo, anticuerpos murinos, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, que tienen secuencias tanto murinas como humanas), anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos. En ejemplos particulares, los anticuerpos son anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos monoclonales específicos de fXI o los fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación pueden ser cualquier isotipo, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgD o IgA. Los anticuerpos pueden ser además de cualquier subtipo. Por ejemplo, los anticuerpos IgG incluyen los subtipos IgG₁, IgG₂ (incluyendo IgG_{2a} e IgG_{2b}), IgG₃ e IgG₄. La clase de un anticuerpo que se une específicamente a fXI puede cambiarse con otro. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla utilizando métodos bien conocidos en la técnica, de manera que no incluya ninguna secuencia de ácido nucleico que codifique la región constante de la cadena ligera o pesada, respectivamente. La molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se une operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una C_L o C_H de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto se puede lograr utilizando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , como se conoce en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a fXI que originalmente era IgG se puede cambiar de clase a una IgM. El cambio de clase también se puede utilizar para convertir una subclase de IgG en otra, tal como de IgG₁ a IgG₂.

Los fragmentos de anticuerpos están abarcados por la presente divulgación, tal como Fab, F(ab')₂ y Fv que incluyen una región variable de cadena pesada y cadena ligera y son capaces de unirse al determinante epitópico en fXI. Estos fragmentos de anticuerpos conservan la capacidad de unirse selectivamente con el antígeno. Estos fragmentos incluyen:

- (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, se puede producir por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;
- (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena intacta ligera y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
- (3) (Fab')₂, el fragmento de anticuerpo se puede obtener por tratamiento del anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por dos enlaces disulfuro;
- (4) Fv, un fragmento manipulado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas;
- (5) Anticuerpo de cadena única (tal como scFv), definida como una molécula genéticamente modificada que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidos por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena única genéticamente fusionada; y
- (6) Un dímero de un anticuerpo de cadena única (scFv)₂, definido como un dímero de un scFv. Esto también se ha denominado "minianticuerpo".

Los métodos para hacer estos fragmentos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

En un grupo adicional de realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos Fv, que son normalmente de aproximadamente 25 kDa y contienen un sitio de unión a antígeno completo con tres CDR en cada cadena pesada y en cada cadena ligera. Para producir estos anticuerpos, la V_H y la V_L se pueden expresar a partir de dos construcciones de ácido nucleico individuales en una célula huésped. Si la V_H y la V_L se expresan de forma no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv normalmente se mantienen juntas por interacciones no covalentes. Sin embargo, estas cadenas tienden a disociarse por dilución, por lo que se han desarrollado métodos para reticular las cadenas a través del glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un enlazador peptídico. Por lo tanto, en un ejemplo, el Fv puede ser un Fv estabilizado por disulfuro (dsFv), en el que la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están unidas químicamente por enlaces disulfuro.

En un ejemplo adicional, los fragmentos Fv comprenden las cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico.

Estas proteínas de unión a antígeno monocatenaria (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica individual con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv son conocidos en la técnica (véase Whitlow *et al.*, *Métodos: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 97, 1991; Bird *et al.*, *Science* 242:423, 1988; patente de EE.UU. n.º 4.946.778; Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11:1271, 1993). También se contemplan los dímeros de un anticuerpo de cadena única (scFv₂).

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener mediante digestión con pepsina o papaína de los anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Como alternativa, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente (véase la patente de Estados Unidos N.º 4.036.945 y la patente de Estados Unidos N.º 4.331.647, y las referencias contenidas en las mismas; Nisonhoff *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman *et al.*, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, página 422, Academic Press, 1967; y Coligan *et al.* en las secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, tal como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadenas ligeras-pesadas monovalentes, otra escisión de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Un experto en la materia se dará cuenta de que pueden producirse variantes conservadoras de los anticuerpos. Tales variantes conservadoras empleadas en fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos dsFv o en fragmentos scFv, conservarán los residuos de aminoácidos críticos necesarios para un correcto plegado y estabilización entre las regiones V_H y V_L , y conservarán las características de carga de los residuos para conservar el bajo pl y la baja toxicidad de las moléculas. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos (tal como, como máximo, una, como máximo dos, como máximo tres, como máximo cuatro o, como máximo, cinco sustituciones de aminoácidos) en las regiones V_H y V_L para aumentar el rendimiento. Los expertos en la técnica conocen bien las tablas de sustitución de aminoácidos conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares.

Además, en el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden uno o más de los anticuerpos monoclonales proporcionados o uno o más fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión que comprenden estos ácidos nucleicos y células huésped aisladas que expresan los ácidos nucleicos. Las composiciones, moléculas de ácido nucleico, vectores y células huésped se describen con mayor detalle a continuación.

En el presente documento también se describen inmunos conjugados que comprenden los anticuerpos monoclonales específicos para fXI. Los inmunos conjugados comprenden un anticuerpo y un compañero de fusión. El compañero de fusión puede ser cualquier agente terapéutico, etiqueta detectable u otro resto. También se describen composiciones que comprenden los inmunos conjugados. Los inmunos conjugados de la presente divulgación se discuten con mayor detalle a continuación.

Las composiciones que comprenden los anticuerpos monoclonales específicos para fXI pueden usarse para fines de investigación, diagnósticos y / o terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden usar para tratar la trombosis o cualquier afección asociada a la activación patológica de fXI. Los métodos de uso de los anticuerpos monoclonales específicos de fXI desvelados y sus fragmentos de unión a antígeno se describen con detalle a continuación.

También se describe un método para inhibir la activación de fXI por el factor XIIa (fXIIa) en un sujeto. El método comprende (a) seleccionar un sujeto que necesita tratamiento; y (b) administrar al sujeto una cantidad inhibitoria de un anticuerpo monoclonal, inmunos conjugado o la composición desvelada en el presente documento. El sujeto que necesita tratamiento puede tener o estar en riesgo de desarrollar trombosis. El sujeto que necesita tratamiento puede ser un sujeto que sufre o tiene riesgo de sufrir un infarto de miocardio, ictus isquémico, tromboembolia pulmonar, coagulación intravascular diseminada, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica grave, cáncer metastásico o una enfermedad infecciosa. El sujeto que necesita tratamiento puede ser un sujeto con activación patológica de fXI. En algunas realizaciones, la cantidad inhibitoria del anticuerpo monoclonal, inmunos conjugado o composición es una cantidad suficiente para inhibir la activación de fXI en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 %. En ejemplos particulares, la cantidad inhibitoria del anticuerpo monoclonal, inmunos conjugado o composición es una

cantidad suficiente para inhibir la activación de fXI en un 90-100 %. El anticuerpo, inmunoc conjugado o composición pueden administrarse utilizando cualquier vía de administración adecuada y cualquier dosis o programa de dosificación adecuados, discutidos con mayor detalle en las siguientes secciones.

- 5 También se proporciona un método para purificar fXI de una muestra biológica mediante el contacto de la muestra con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos específicos de fXI de la divulgación se pueden usar para inmunoprecipitar el fXI de cualquier muestra biológica de cualquier especie de mamífero. Los métodos de inmunoprecipitación son bien conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, el anticuerpo específico de fXI está conjugado a una perla, tal como
- 10 una perla magnética que permite una separación eficiente del anticuerpo unido al antígeno (por ejemplo, fXI unido a un anticuerpo específico de fXI). La muestra biológica puede ser cualquier muestra en la que se encuentre la proteína fXI. En algunos ejemplos, la muestra biológica es una muestra fluida, tal como una muestra de sangre, de suero o plasma, o muestra de tejido.
- 15 Además, se proporciona un método de diagnóstico para detectar el fXI en una muestra biológica o medir el nivel de fXI en una muestra biológica. En algunos ejemplos, la muestra biológica es una muestra fluida, tal como una muestra de sangre, de suero o plasma, o muestra de tejido. Los métodos para detectar proteínas en una muestra biológica, o medir el nivel de una proteína en una muestra biológica, son bien conocidos en la técnica.

20 V. Factor XI y la cascada de coagulación

El factor humano XI (fXI) se sintetiza como un único polipéptido, pero circula como una glicoproteína de dos cadenas con un peso molecular de aproximadamente 160 kD. Las dos cadenas son polipéptidos unidos por disulfuro idénticos con pesos moleculares de aproximadamente 80 kD. El fXI es la forma cimógena del factor XI activado

25 (fXIa). El fXI se activa al factor XIa por el factor XIIa, por la trombina o por un mecanismo autocatalítico (véase la figura 8). En seres humanos, el gen para fXI (F11) está ubicado en el extremo distal del cromosoma 4 (4q35.2) y contiene 15 exones distribuidos en aproximadamente 25 kb de ADN genómico (Asaki *et al.*, *Biochemistry* 26:7221-7228, 1987; Kato *et al.*, *Cytogenet. Cell Genet.* 52:77, 1989).

- 30 El sitio de escisión para la activación del factor XI por el factor XIIa es un enlace peptídico interno entre Arg-369 e Ile-370 en cada cadena polipeptídica (Fujikawa *et al.*, *Biochemistry* 25:2417-2424, 1986). Cada cadena pesada de factor XIa (369 aminoácidos) contiene cuatro repeticiones en tándem de 90-91 aminoácidos llamados dominios manzana (designados A1-A4) más un péptido de conexión corto (Fujikawa *et al.*, *Biochemistry* 25:2417-2424, 1986; Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373 -36378, 1999). Las cadenas ligeras de fXIa (cada una de 238 aminoácidos)
- 35 contienen la porción catalítica de la enzima con secuencias que son típicas de la familia de la tripsina de las serina proteasas ((Fujikawa *et al.*, *Biochemistry* 25:2417-2424, 1986). El fXI activado desencadena la fase media de la ruta intrínseca de la coagulación sanguínea activando el factor IX. Los individuos que tienen defectos en el fXI desarrollan hemofilia C (también conocido como síndrome Rosenthal), una anomalía de la coagulación de la sangre.
- 40 Durante la coagulación iniciada por activación de contacto, los factores XII, XI y IX se activan en secuencia, promoviendo la generación de trombina (Gailani y Broze, *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Scriver *et al.*, eds., Nueva York, NY: McGraw-Hill, páginas 4433-4453, 2001). Las diferentes diátesis hemorrágicas asociadas a deficiencias de estas proteínas, sin embargo, indican que la situación *in vivo* es más compleja. El Factor VIIa/TF también activa el factor IX (Broze *et al.*, *Biochemistry* 29:7539-46, 1990; Davie *et al.*, *Biochemistry* 30:10363-
- 45 10370, 1991; Osterud *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5260-5264, 1977) que explica el sangrado más grave en la deficiencia de fIX en relación con la deficiencia de fXI. De forma análoga, la activación de fXI por una proteasa distinta de fXIIa puede explicar los diferentes fenotipos de la deficiencia de fXI y fXII. Un cuerpo importante de trabajos anteriores apoya un modelo en el que el fXI contribuye a la coagulación en ausencia de fXII (von dem Borne *et al.*, *Thromb. Haemost.* 78:834 -839, 1997; von dem Borne *et al.*, *Blood* 86:3035-3042, 1995; von dem Borne *et al.*,
- 50 *J. Clin. Invest.* 99:2323 -2327, 1997; Cawthern *et al.*, *Blood* 91:4581-4592, 1998; Keularts *et al.*, *Thromb. Haemost.* 85:1060 -1065, 2001; Oliver *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:170 -177, 1999; Wielders *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1138 -1142, 2004). La trombina se ha considerado la probable proteasa activadora de fXI en estos estudios, según los resultados de sistemas de proteínas purificadas (Naito *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:7353 -7358, 1991; Gailani *et al.*, *Science* 253:909-912 (1991). Recientemente, Pedicord *et al.* examinó la activación de fXI en plasma usando un ensayo que mide los complejos del inhibidor de serpina C1 (C1-INH) y fXIa (límite inferior de detección de aproximadamente 5 pM fXIa) (Pedicord *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:12855-12860, 2007). La generación de fXIa no se detectó después de la adición de trombina o TF al plasma que contiene el CTI inhibidor del XIIa. En los estudios descritos en los siguientes ejemplos, el plasma se preparó a partir de la sangre recogida directamente en CTI. La omisión de CTI durante la recolección dio como resultado la activación de fXI, es probable
- 60 que durante la flebotomía o la preparación de plasma. De acuerdo con esto, un anticuerpo frente a fXI inhibió un indicador de la actividad de coagulación (escisión del sustrato cromogénico) solo en plasma preparado en ausencia de CTI. Se postuló que los estudios que examinan la activación de fXI en ausencia de fXII pueden no haber tomado suficientes etapas para explicar la formación de fXIa durante la preparación del plasma, lo que lleva a la conclusión errónea de que el fXIa se generó de manera independiente de fXII después del inicio de la coagulación por TF o trombina.
- 65 von dem Borne *et al.* demostraron primero que la formación de fibrina y la resistencia a la fibrinólisis dependen de fXI

- en plasma inducido a coagular con bajas concentraciones de trombina o TF (von dem Borne *et al.*, *Blood* 86:3035-3042, 1995). Solo se requirió aproximadamente 1 pM de fXIa para proteger los coágulos de la fibrinólisis, un valor por debajo del límite de detección del ensayo utilizado por Pedicord *et al.* Este estudio utilizó plasma deficiente en fXII que posteriormente se agotó de fXI e incluyó una evaluación de fXIa en las preparaciones de fXI. Se determinó
- 5 que la contaminación con fXIa era insuficiente para explicar el efecto antifibrinolítico de fXI. También se demostró que una forma estable del precursor de trombina meizotrombina promovía la resistencia dependiente de fXI a la fibrinólisis, consistente con la activación de fXI por un producto de activación de protrombina (von dem Borne *et al.*, *Thromb. Haemost.* 78:834-839, 1997). Cawthorn *et al.* confirmaron que el fXI tenía un efecto positivo sobre los marcadores de la generación de trombina a 5 pM de TF en sangre entera (Cawthorn *et al.*, *Blood* 91:4581-4592,
- 10 1998), y Keularts *et al.* usaron un ensayo de generación de trombina para demostrar directamente la dependencia de fXI de la generación de trombina en plasma estimulado con aproximadamente 2 pM de TF (Keularts *et al.*, *Thromb. Haemost.* 85:1060-1065, 2001). Si bien es difícil determinar qué proteasa fue la responsable de la activación de fXI en estos estudios, la trombina se consideró el candidato más probable.
- 15 Los estudios descritos en los ejemplos a continuación emplearon dos sistemas de plasma diseñados para abordar la preocupación de la contaminación por fXIa al evitar la exposición de fXI a fXIIa. El primer sistema utilizó plasma deficiente en fXI suplementado con CTI, al que se añadió fXI tratado con DFP, mientras que el segundo sistema utilizó plasma deficiente en fXII en el que el fXI endógeno nunca ha estado expuesto a fXIIa. Los resultados con ambos sistemas mostraron que se requiere fXI para la generación de trombina en plasma recalcificado estimulado
- 20 con bajas concentraciones de TF, fXIa o α -trombina. La recalcificación en ausencia de TF, fXIa o α -trombina no soportó la generación de trombina, lo que indica que el fXIa contaminante estaba por debajo de un umbral para iniciar el proceso. También se probó la sensibilidad del ensayo a fXIa. En plasma deficiente en fXI, fXIa 3 pM promovió la generación de trombina de manera débil e inconsistente. Por el contrario, en plasma que contiene fXI, la generación de trombina se inició de manera consistente mediante fXIa 0,3 pM. Si el último resultado se debió a la contaminación de fXI con fXIa suficiente para promover la generación de trombina (probablemente > 3 pM), el disparador de fXIa 0,3 pM no debería haber sido necesario y la recalcificación sola debería haber promovido la generación de trombina. Esto no se observó. Que una fracción de la cantidad de fXIa es necesaria para desencadenar la generación de trombina en ausencia de fXI, indujo generación de trombina inducida en su presencia, indica fuertemente que el fXIa se genera a partir de fXI endógeno después de la adición de fXIa.
- 25 30 También se probó la hipótesis de que se requirió un circuito de retroalimentación que involucraba la activación de trombina de fXI para la activación del factor IX, utilizando variantes de fXI recombinantes. En plasma estimulado con trombina o TF, se requiere la activación por fXIa del factor IX, como el bloqueo del exosito de unión al factor IX en el dominio A3 de fXIa con un anticuerpo, o interrumpiéndolo con mutaciones puntuales (Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373-36378, 1999), impidió la generación de trombina. Asimismo, una variante de fXI que se activa lentamente por la trombina, soportó la generación de trombina mal. Esta variante, fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴, tiene actividad normal en los ensayos de coagulación iniciados por activación de contacto que indican que fXIIa se activa razonablemente bien en un ambiente de plasma y, posteriormente, activa el factor IX.
- 35 40 Estudios previos sugirieron que las plaquetas activadas mejoran la activación de fXI por la trombina (Baglia *et al.*, *Biochemistry* 37:2271-2281, 1998), aunque el trabajo posterior no lo ha confirmado (Walsh, *Biochemistry* 46:12886-12887, 2007). En un sistema compuesto por factores de coagulación purificados, Oliver *et al.* observaron que la activación de fXI, presumiblemente por la trombina, fue mejorada con plaquetas (Oliver *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:170-177, 1999). Wielders *et al.* mostraron que la trombina inicia y propaga la generación de trombina en el plasma tratado con CTI solo cuando las plaquetas y el fXI están presentes (Wielders *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1138-1142, 2004).
- 45 Mientras que los datos desvelados en el presente documento demuestran una contribución independiente de fXII del fXI a la generación de trombina, también es posible que el fXIIa desempeñe un papel en la activación de fXI en la coagulación normal o patológica. De hecho, estudios recientes con ratones deficientes en fXII sugieren que un proceso que implica la vía intrínseca, posiblemente iniciado por un proceso de activación de contacto, contribuye a la formación de trombos arteriales y a la lesión por isquemia-reperfusión del sistema nervioso central (Renné *et al.*, *J. Exp. Med.* 202:271-281, 2005; Kleinschnitz *et al.*, *J. Exp. Med.* 203:513-518, 2006).
- 50 55 Por último, es ilustrativo considerar la activación de fXI desde la perspectiva de la evolución de los vertebrados. Mientras que fXI se encuentra solo en mamíferos, un gen para una proteína que es claramente ancestral del fXI y la proteasa homóloga precalicreína (PK) aparece primero en anfibios (Ponczek *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 6:1876-1883, 2008). Es probable que todos los vertebrados terrestres no mamíferos tengan este antecesor PK / fXI. fXII, que activa el fXI y la PK durante la activación de contacto, también aparece por primera vez en los anfibios (Ponczek *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 6:1876-1883, 2008) y bien puede ser un activador del predecesor de PK / fXI, reteniendo la capacidad de activar fXI y PK después de la duplicación génica que produjo estas proteínas del predecesor. Sin embargo, la expresión de fXII se ha perdido al menos dos veces durante la evolución de los vertebrados. Los cetáceos (ballenas, marsopas y delfines), que comparten un ancestro terrestre común, carecen de fXII (Robinson *et al.*, *Science* 166:1420-1422, 1969). Una mutación puntual en un ancestro común de estos animales inactivó el gen del fXII (Semba *et al.*, *Thromb Res.* 90:31-37, 1998). A pesar de esto, no hay evidencia de deterioro del gen del fXI (Robinson *et al.*, *Science* 166:1420-1422, 1969), lo que indica que su producto permanece bajo presión de selección
- 60 65

porque proporciona una función adaptativa. De forma análoga, las aves carecen de fXII (Ponczek *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 6:1876 -1883, 2008; Soulier *et al.*, *Brit. J. Hematol.* 5:121 -138, 1959; Frost *et al.*, *Immunopharmacology* 45:75-81, 1999; Weir-M *et al.*, *Thromb. Res.* 113:269-273, 2004), pero tienen un gen intacto para el predecesor de PK / fXI (Ponczek *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 6:1876 -1883, 2008). En este caso, existe evidencia convincente de que el gen del fXII se perdió durante el linaje que va desde los reptiles a las aves (Ponczek *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 6:1876 -1883, 2008). Por lo tanto, el fXI y su predecesor pueden persistir en ausencia de fXII, apoyando la conclusión de que más de una proteasa puede activar estas proteínas para permitirles cumplir sus funciones fisiológicas.

10 VI. Polinucleótidos y polipéptidos de los anticuerpos frente a fXI

Las moléculas de ácido nucleico (también denominadas polinucleótidos) que codifican los polipéptidos proporcionados en el presente documento (incluidos, pero sin limitaciones, anticuerpos, inmunos conjugados y proteínas de fusión) pueden ser fácilmente producidos por un experto en la técnica, utilizando las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento, las secuencias disponibles en la técnica y el código genético. Además, un experto puede construir fácilmente diversos clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que codifican el mismo compañero de fusión o secuencia de anticuerpo. Por lo tanto, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, conjugados y proteínas de fusión se proporcionan en el presente documento. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal específico de fXI comprende la SEQ ID NO: 2 o una porción de la misma (tal como una porción que codifica una o más CDR). En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal específico de fXI comprende la SEQ ID NO: 4 o una porción de la misma (tal como una porción que codifica una o más CDR).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos que se unen específicamente a fXI se pueden preparar por cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, clonación de las secuencias apropiadas o por síntesis química directa. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Esto se puede convertir en ADN de doble cadena mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa utilizando la única cadena como molde. Un experto reconocería que, si bien la síntesis química del ADN se limita generalmente a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligadura de secuencias más cortas.

Los ácidos nucleicos de ejemplo que codifican anticuerpos que se unen específicamente a fXI pueden prepararse mediante técnicas de clonación. Los ejemplos de técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, e instrucciones suficientes para dirigir a las personas expertas han sido previamente divulgados. Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-fXI también pueden modificarse. La modificación por mutagénesis dirigida al sitio es bien conocida en la técnica. Los ácidos nucleicos también pueden prepararse por métodos de amplificación. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia autosostenida (3SR). Una amplia variedad de métodos de clonación, células huésped y las metodologías de amplificación *in vitro* son bien conocidas por los expertos.

En algunas realizaciones, se prepara un inmunos conjugado insertando el ADNc que codifica un anticuerpo monoclonal específico de fXI en un vector que comprende el ADNc que codifica el EM. La inserción se realiza de manera que el anticuerpo y el EM se lean en el marco, es decir, en un polipéptido continuo que contiene una región de anticuerpo funcional y una región de EM funcional. En una realización, el ADNc que codifica un EM, etiqueta o enzima está ligado a un anticuerpo para que el EM, etiqueta o enzima se encuentre en el extremo amino del anticuerpo. En otra realización, el EM, etiqueta o enzima está localizado en el extremo amino del anticuerpo. En otro ejemplo, el ADNc que codifica el EM, la etiqueta o enzima está ligado a una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, de modo que el EM, etiqueta o enzima se localice en el extremo carboxilo de la región variable de la cadena pesada. Posteriormente, la región variable de la cadena pesada puede estar ligada a una región variable de cadena ligera del anticuerpo usando enlaces disulfuro. En aún otro ejemplo, el ADNc que codifica un EM, etiqueta o enzima está ligado a una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo, de modo que el EM, etiqueta o enzima se localice en el extremo carboxilo de la región variable de la cadena ligera. Posteriormente, la región variable de la cadena ligera puede estar ligada a una región variable de cadena pesada del anticuerpo usando enlaces disulfuro.

Una vez que los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo específico para fXI o un inmunos conjugado del mismo, se aíslan y se clonan, la proteína deseada puede expresarse en una célula modificada recombinante, tal como células bacterianas, vegetales, levadura, de insectos y mamíferos. Se espera que los expertos en la técnica conozcan los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas que incluyen *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levadura y varias células eucariotas superiores tales como líneas celulares Cos, CHO, Hela y de mieloma.

Una o más secuencias de ADN que codifican el anticuerpo o fragmento del mismo pueden expresarse *in vitro* por transferencia de ADN a una célula huésped adecuada. La célula puede ser procarionta o eucariota. El término

también incluye cualquier progenie de la célula huésped del sujeto. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula parental, ya que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Los métodos de transferencia estable, que significan que el ADN extraño se mantiene continuamente en el huésped, se conocen en la materia. Los hibridomas que expresan los anticuerpos de interés también se incluyen en esta divulgación.

5 La expresión de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas aisladas descritas en el presente documento se puede lograr uniendo operativamente el ADN o el ADNc a un promotor (que es constitutivo o inducible), seguido de la incorporación en un casete de expresión. Los casetes pueden ser adecuados para la replicación e integración en procariontes o eucariotes. Los casetes de expresión típicos contienen secuencias específicas útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Por ejemplo, los casetes de expresión pueden incluir promotores adecuados, potenciadores, terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación, un codón de iniciación (es decir, ATG) frente a un gen que codifica una proteína, la señal de corte y empalme para los intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de dicho gen para permitir la traducción adecuada del ARNm y los codones de terminación.

10 Para obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un fuerte promotor para dirigir la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción / traducción. Para *E. coli*, esto incluye un promotor, tal como los promotores de T7, trp, lac o lambda, un sitio de unión al ribosoma y, preferentemente, una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y / o un potenciador derivado, por ejemplo, de un gen de inmunoglobulina, SV40 o citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y puede incluir además secuencias donantes yceptoras de corte y empalme. Los casetes se pueden transferir a la célula huésped elegida mediante métodos bien conocidos, tal como la transformación o la electroporación para *E. coli* y el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse por la resistencia a los antibióticos conferidos por los genes contenidos en los casetes, tales como los genes ara amp, gpt, neo e hig.

15 Cuando el huésped es un eucariota, se pueden usar tales métodos de transfección de ADN, como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales, tal como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas o vectores de virus. Las células eucariotas también pueden cotransformarse con secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo, anticuerpo marcado o fragmento funcional del mismo, y una segunda molécula de ADN extraño que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina quinasa del herpes simple. Otro método es utilizar un vector viral eucariótico, tal como el virus de simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, *Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Un experto en la materia puede usar fácilmente sistemas de expresión tales como plásmidos y vectores de uso para producir proteínas en células que incluyen células eucariotas superiores, tales como las líneas celulares Cos, CHO, HeLa y de mieloma.

20 Se pueden realizar modificaciones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en el presente documento (es decir, un anticuerpo monoclonal específico de fXI o un inmunocombinado que comprende el anticuerpo) sin disminuir su actividad biológica. Se pueden realizar algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula que se va a dirigir en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas en la materia e incluyen por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, aminoácidos adicionales colocados en cualquiera de los extremos para crear sitios de restricción localizados de forma conveniente o aminoácidos adicionales (tales como poli His) para ayudar en las etapas de purificación. Además de métodos recombinantes, los inmunocombinados, restos efectoros y anticuerpos de la presente divulgación también se pueden construir completos o en parte usando síntesis peptídica estándar bien conocida en la técnica.

25 Una vez expresados, los inmunocombinados recombinantes, anticuerpos y / o compañeros de fusión pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, y similares (véase, en general, R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982). Los anticuerpos e inmunocombinados no necesitan ser 100 % puros. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad como se desee, si se van a utilizar terapéuticamente, los polipéptidos deben estar sustancialmente libres de endotoxinas.

30 Se han descrito métodos para la expresión de anticuerpos y / o plegamiento a una forma activa apropiada, incluyendo anticuerpos monocatenarios, de bacterias tales como *E. coli* y son bien conocidos y son aplicables a los anticuerpos desvelados en el presente documento (véase, Buchner *et al.*, *Anal. Biochem.* 205:263 -270, 1992; Pluckthun, *Biotechnology* 9:545, 1991; Huse *et al.*, *Science* 246:1275, 1989 y Ward *et al.*, *Nature* 341:544, 1989).

35 A menudo, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias se aíslan de los cuerpos de inclusión y requieren solubilización utilizando desnaturizantes fuertes y su posterior plegamiento. Durante la etapa de solubilización, como es bien sabido en la materia, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un tampón de ejemplo con un agente reductor es: Tris 0,1 M pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE 0,3 M (ditioeritrol). La reoxidación de los enlaces disulfuro puede producirse en presencia de reactivos de tiol de bajo peso

molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena *et al.* (*Biochemistry* 9: 5015-5021, 1970), y especialmente según lo descrito por Buchner *et al.* (*Anal. Biochem.* 205:263 -270, 1992).

5 La renaturalización se realiza normalmente por dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en un tampón de repliegamiento. Un tampón de ejemplo es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM (GSSG) y EDTA 2 mM.

10 Como una modificación al protocolo de purificación de anticuerpos bicatenarios, las regiones de las cadenas pesada y ligera se solubilizan y reducen por separado y luego se combinan en la solución de repliegamiento. Se obtiene un rendimiento de ejemplo cuando estas dos proteínas se mezclan en una relación molar, tal que no excede un exceso molar de 5 veces de una proteína sobre la otra. El exceso de glutatión oxidado u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular se pueden añadir a la solución de repliegamiento una vez que se completa el barajado redox.

15 Además de los métodos recombinantes, los anticuerpos, anticuerpos marcados y fragmentos funcionales de los mismos que se desvelan en el presente documento también pueden construirse en su totalidad o en parte utilizando la síntesis de péptidos estándar. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud se puede lograr uniendo el aminoácido en C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Las técnicas para la síntesis en fase sólida están descritas por Barany y Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.* pág. 3-284; Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156, 1963 y Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed.*, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984. Las proteínas de mayor longitud se pueden sintetizar mediante la condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Los métodos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (tal como el uso del reactivo de acoplamiento N, N'-dicilohexilcarbodimida) son bien conocidos en la técnica.

25

VII. Conjugados de anticuerpos y proteínas de fusión

30 Los anticuerpos monoclonales anti-fXI y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en el presente documento se pueden fusionar de manera recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugado químicamente (incluidas las conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. La presente divulgación contempla conjugados de anticuerpos que comprenden un anticuerpo específico de fXI o fragmento de anticuerpo y cualquier compañero de fusión adecuado. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse con moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección, o con compañeros de fusión tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 92/08495; documento WO 91/14438; y WO 89/12624; la patente de EE.UU. n.º 5.314.995; y el documento EP 396,387 para enseñanzas generales relacionadas con la fabricación de proteínas de fusión basadas en anticuerpos). La presente divulgación también abarca proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-fXI y un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, el polipéptido heterólogo al que se fusiona el anticuerpo puede ser útil para la función, o podría aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos, o podría servir como una secuencia marcadora que facilite la purificación o detección.

40

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

50 Los anticuerpos monoclonales anti-fXI de la presente divulgación pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de diversas moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de objetivos o para realizar pruebas de imagen o terapia de un sujeto. En particular, los anticuerpos monoclonales anti-factor XI pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

55 Las técnicas para conjugar diversos restos con un anticuerpo anti-factor XI son bien conocidas. Se pueden usar medios de unión covalente y no covalente. El procedimiento para unir un compañero de fusión a un anticuerpo varía según la estructura química del efector. Los polipéptidos normalmente contienen diversos grupos funcionales; tales como ácido carboxílico (COOH), grupos de amina libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión del compañero de fusión. Como alternativa, el anticuerpo se deriva para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras. El enlazador puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo al compañero de fusión. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto al anticuerpo como al compañero de fusión. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, aunque no de forma limitativa, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo y el compañero de fusión son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (tal como a través de un enlace disulfuro a la cisteína) o a los grupos amino y carboxilo en el carbono alfa de los aminoácidos terminales.

65

En algunas circunstancias, es deseable liberar el compañero de fusión del anticuerpo cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, en estas circunstancias, los inmunoconjugados comprenden enlaces que se pueden romper en las proximidades del sitio objetivo. La escisión del enlazador para liberar el compañero de fusión del anticuerpo puede acelerarse mediante actividad enzimática o condiciones a las que el inmunoconjugado es sometido en las proximidades del sitio objetivo.

En vista del gran número de procedimientos que se han comunicado para unir varios compuestos radiodiagnósticos, compuestos radioterapéuticos, etiquetas (tales como enzimas y moléculas fluorescentes, fármacos, toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la técnica podrá determinar un procedimiento adecuado para unir un agente dado a un anticuerpo u otro polipéptido.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos desvelados en el presente documento pueden derivatizarse o unirse a otra molécula (tal como otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o porción de los mismos se derivatizan de modo tal que la unión a fXI no se ve afectada de forma adversa por la derivatización o marcaje. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar unido funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, tal como para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos que reaccionan de manera distinta separados por un espaciador adecuado (tal como, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidrosuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores están disponibles en Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

Un anticuerpo que se une específicamente a fXI puede marcarse con un resto detectable. Los agentes de detección útiles incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fosfuros de lantánidos y similares. Los marcadores bioluminiscentes también son de utilidad, tal como luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP). Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tal como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo está marcado con una enzima detectable, se puede detectar mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que se puede discernir. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano, la adición de peróxido de hidrógeno y de diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es visualmente detectable. También se puede marcar un anticuerpo con biotina y detectarse a través de medición indirecta de la unión de avidina o de estreptavidina. Cabe destacar que la propia avidina se puede marcar con una enzima o un marcador fluorescente.

Un anticuerpo puede estar marcado con un agente magnético, tal como gadolinio. Los anticuerpos también se pueden marcar con lantánidos (tal como europio y disprosio) y manganeso. Las partículas paramagnéticas, tales como óxido de hierro superparamagnético también son de uso como etiquetas. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido por un indicador secundario (tal como secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, marcas de epítipo). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Un anticuerpo también se puede marcar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse para fines diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador se puede usar para detectar fXI por rayos X, espectros de emisión u otras técnicas diagnósticas. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, aunque no de forma limitativa, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Los medios para detectar tales etiquetas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse utilizando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse utilizando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de la reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando el marcador coloreado.

Un anticuerpo también se puede derivatizar con un grupo químico, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, tal como para aumentar la semivida sérica o para aumentar la unión al tejido.

VIII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Los anticuerpos monoclonales anti-fXI (y sus fragmentos de unión a antígeno) de la divulgación pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, tal como mediante mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Se describen los vehículos adecuados y sus formulaciones, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (16ª ed., Osol, A. (ed.), Mack, Easton PA, 1980). Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para una administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti-fXI solo o con una cantidad adecuada de vehículo portador.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en mezcla con un vehículo adecuado, diluyente o excipiente, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, adyuvantes, aditivos gelificantes o que aumentan la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colores, y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Asimismo, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para liberación inmediata o liberación controlada.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos monoclonales anti-fXI de la divulgación pueden administrarse en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica médica o veterinaria, teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y la afección del paciente en particular y la vía de administración. La cantidad y el momento de la administración son a discreción del médico o veterinario encargado del tratamiento para lograr los propósitos deseados. La vía de administración puede ser a través de cualquier vía que administre una dosis segura y terapéuticamente eficaz (o una dosis inhibitoria) de un anticuerpo monoclonal anti-fXI desvelado en el presente documento en la sangre de un animal o ser humano. El anticuerpo puede formularse para administración sistémica o local. Las formas de administración incluyen, aunque no de forma limitativa, sistémicos, tópica, las vías de administración enteral y parenteral. Las vías enterales incluyen la administración oral y gastrointestinal. Las vías de administración parenteral incluyen las vías intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, y transmucosa. Otras vías de administración incluyen la administración epidural o intratecal. En un ejemplo, el anticuerpo que se une específicamente a fXI está formulado para administración parenteral, tal como administración intravenosa.

La dosis efectiva y la vía de administración están determinadas por el rango terapéutico y la naturaleza del compuesto, y por factores conocidos, tales como la edad, el peso y la afección del sujeto, así como la DL50 y otros procedimientos de selección que son conocidos y no requieren experimentación indebida. El agente terapéutico puede administrarse al receptor como un bolo o mediante un suministro sostenido (continuo o intermitente). Cuando el suministro de una dosis se mantiene durante un período, que puede ser del orden de unos pocos minutos a varios días, semanas o meses, o pueden administrarse crónicamente durante un período de años, la dosis puede expresarse como el peso del agente terapéutico / kg de peso corporal del paciente / unidad de tiempo de administración.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-fXI o un fragmento funcional del mismo que cuando se administra produce una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente que lo necesita. En general, una dosis terapéuticamente eficaz es similar a la "dosis inhibitoria" o "cantidad inhibitoria", términos que se refieren a la dosis de anticuerpo específico de fXI requerida para inhibir la activación de fXI. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-fXI está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg / kg a aproximadamente 10 mg / kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. En otras realizaciones, las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo monoclonal anti-factor XI, es de aproximadamente 0,01 mg / kg, aproximadamente 0,03 mg / kg, aproximadamente 0,1 mg / kg, aproximadamente 0,3 mg / kg, aproximadamente 0,5 mg / kg, aproximadamente 1 mg / kg, aproximadamente 1,5 mg / kg, aproximadamente 2 mg / kg, aproximadamente 2,5 mg / kg, aproximadamente 3 mg / kg, aproximadamente 5 mg / kg, aproximadamente 7 mg / kg, aproximadamente 10 mg / kg, u otras dosis similares dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 mg / kg a aproximadamente 10 mg / kg. Se reconoce que el método de tratamiento puede comprender una administración única de una dosis terapéuticamente eficaz (o dosis inhibitoria) o administraciones múltiples de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-fXI.

En algunas realizaciones, la dosis inhibitoria (o dosis terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo (ya sea solo o como parte de un inmunocombinado o composición de la presente divulgación) es una dosis que inhibe la activación de fXI en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 %. En ejemplos particulares, la activación de fXI está inhibida en un 90-100 %.

En algunas realizaciones, los anticuerpos deben administrarse diariamente, en días alternos, cada quince días o cada semana. En ejemplos específicos, los anticuerpos deben administrarse diariamente o cada quince días. En los métodos que se divulgan en el presente documento, la administración de un "anticuerpo" incluye anticuerpos que forman parte de inmunocombinados de las composiciones de la divulgación.

Los anticuerpos pueden administrarse por infusión lenta, en lugar de en una inyección intravenosa o bolo. En un ejemplo, se administra una mayor dosis de carga, administrándose las dosis de mantenimiento posteriores a un nivel inferior. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg / kg durante un período de unos 90 minutos, seguido de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg / kg infundidos durante un período de 30 minutos si la dosis anterior fue bien tolerada.

Se proporcionan composiciones que incluyen uno o más de los anticuerpos que se unen específicamente a fXI que se desvelan en el presente documento en un vehículo. También se proporcionan composiciones que comprenden inmunoconjugados. Las composiciones pueden prepararse en formas de dosificación unitaria para administración a un sujeto.

Los anticuerpos pueden proporcionarse en forma liofilizada y rehidratarse con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en soluciones estériles de concentración conocida. La solución de anticuerpo se añade después a una bolsa de infusión que contiene 0,9 % de cloruro de sodio, USP, y se administra normalmente en una dosis de 0,5 a 15 mg / kg de peso corporal. Se dispone de una experiencia considerable en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpos.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada (o liberación prolongada) se pueden hacer como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas de partículas. Para una visión general de los sistemas de suministro de proteínas, consúltese Banga, A.J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como un núcleo central. En las microesferas, la terapéutica se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas más pequeñas que aproximadamente 1 μm generalmente se denominan nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente.

Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 μm , por lo que solo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas tienen normalmente aproximadamente 100 μm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véanse, por ejemplo, Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, pág. 219-342 (1994); y Tice y Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, pág. 315-339, (1992).

Los polímeros pueden usarse para la liberación controlada por iones de las composiciones de anticuerpos desveladas en el presente documento. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para uso en la administración controlada de fármacos (Langer, *Accounts Chem. Res.* 26:537 -542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxamer 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y administración sostenida de interleucina-2 y ureasa recombinantes (Johnston *et al.*, *Pharm. Res.* 9:425 -434, 1992; y Pec *et al.*, *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58-65, 1990). Como alternativa, la hidroxiapatita se ha utilizado como microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema *et al.*, *Int. J. Pharm.* 112:215 -224, 1994). En otro aspecto más, los liposomas se utilizan para la liberación controlada, así como para la orientación al fármaco del fármaco capsulado de lípidos (Betageri *et al.*, *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para el suministro controlado de proteínas terapéuticas (véanse la patente de Estados Unidos N.º 5.055.303; la patente de EE.UU. n.º 5.188.837; la patente de EE.UU. n.º 4.235.871; la patente de EE.UU. n.º 4.501.728; la patente de EE.UU. n.º 4.837.028; la patente de EE.UU. n.º 4.957.735; la patente de EE.UU. n.º 5.019.369; la patente de EE.UU. n.º 5.055.303; la patente de EE.UU. n.º 5.514.670; la patente de EE.UU. n.º 5.413.797; la patente de EE.UU. n.º 5.268.164; la patente de EE.UU. n.º 5.004.697; la patente de EE.UU. n.º 4.902.505; la patente de EE.UU. n.º 5.506.206; la patente de EE.UU. n.º 5.271.961; la patente de Estados Unidos n.º 5.254.342 y la Patente de Estados Unidos n.º 5.534.496).

IX. Métodos de uso de anticuerpos anti-factor XI

Los anticuerpos específicos para fXI desvelados en el presente documento se pueden usar para diversos fines de investigaciones, diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos desvelados pueden usarse para estudiar los efectos del bloqueo de la activación de fXI y / o la inhibición de la unión de fXI a fXIa. Los anticuerpos específicos de fXI también se pueden usar para purificar fXI de mamíferos o de productos de células recombinantes. Además, los anticuerpos desvelados son útiles como reactivos de diagnóstico, tal como para la detección de fXI en sangre, tejido u otra muestra biológica.

En consecuencia, en el presente documento se proporciona un método para purificar fXI de una muestra biológica mediante el contacto de la muestra con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos específicos de fXI de la divulgación se pueden usar para inmunoprecipitar el fXI de cualquier muestra biológica de cualquier especie de mamífero. Los métodos de inmunoprecipitación son bien conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, el anticuerpo específico de fXI está conjugado a una perla, tal como una perla magnética que permite una separación eficiente del anticuerpo unido al antígeno (por ejemplo, fXI unido a un anticuerpo específico de fXI). La muestra biológica puede ser cualquier muestra en la que se encuentre la proteína fXI. En algunos ejemplos, la muestra biológica es una muestra fluida, tal

como una muestra de sangre, de suero o plasma, o muestra de tejido.

Además, se proporciona un método de diagnóstico para detectar el fXI en una muestra biológica o medir el nivel de fXI en una muestra biológica. En algunos ejemplos, la muestra biológica es una muestra fluida, tal como una muestra de sangre, de suero o plasma, o muestra de tejido. Los métodos para detectar proteínas en una muestra biológica, o medir el nivel de una proteína en una muestra biológica, son bien conocidos en la técnica.

Por otra parte, debido al importante papel que desempeñan las vías de coagulación (o la interrupción de las mismas) en numerosas enfermedades y trastornos, los anticuerpos anti-fXI desvelados en el presente documento pueden usarse para una amplia gama de fines terapéuticos. Los anticuerpos específicos de fXI desvelados en el presente documento pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar cualquier enfermedad o trastorno en el que la inhibición de la activación de fXI resulte en la prevención o el tratamiento de la enfermedad o trastorno. Los anticuerpos fXI desvelados son deseables como agentes terapéuticos debido a su capacidad para prevenir o inhibir la trombosis sin alterar la hemostasia.

En algunos enfoques, los anticuerpos específicos de fXI desvelados pueden usarse para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la activación patológica de fXI. Por ejemplo, dichas enfermedades o trastornos incluyen aquellos en los que la inhibición de la activación por contacto de la coagulación beneficiaría al sujeto que tiene la enfermedad o trastorno.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-fXI desvelados pueden usarse en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la trombosis o el tromboembolismo en un sujeto que necesita tal tratamiento. Tal como se divulga en la presente memoria, la administración de los anticuerpos anti-fXI no altera la hemostasia en el sujeto.

Los anticuerpos monoclonales anti-fXI de la divulgación se pueden usar para tratar afecciones caracterizadas por oclusiones vasculares, tales como las que se producen como resultado de la formación de trombos. Las afecciones que se caracterizan por oclusiones vasculares que se contemplan para el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-fXI incluyen aquellas que afectan a las arterias, los capilares y la vasculatura venosa. En las arterias coronarias, la formación de trombo oclusivo a menudo sigue a la ruptura de la placa aterosclerótica. Esta oclusión es la principal causa de infarto agudo de miocardio y angina inestable. También pueden producirse oclusiones coronarias después de infecciones, inflamación, terapia trombolítica, angioplastia, y colocación de injertos. Principios similares se aplican a otras partes de la vasculatura arterial e incluyen, entre otros, la formación de trombos en las arterias carótidas, que es la causa principal de isquemia cerebral e ictus transitorio o permanente.

En ejemplos particulares, las moléculas de anticuerpos descritas se utilizan para tratar enfermedades vasculares, tales como cardiopatía isquémica o no isquémica, o ictus. En otros ejemplos, los anticuerpos específicos de fXI se usan para tratar enfermedades ateroscleróticas.

La trombosis venosa a menudo sigue a la estasis, infecciones, reacciones inflamatorias y cirugía mayor de las extremidades inferiores o del área abdominal. La trombosis venosa profunda produce una disminución del flujo sanguíneo desde el área distal al trombo y predispone a la embolia pulmonar. La embolia pulmonar es una causa importante de mortalidad posquirúrgica. La coagulación intravascular diseminada (CIC) y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) se producen habitualmente en todos los sistemas vasculares durante la sepsis bacteriana, la entrada de material extraño en el torrente sanguíneo posterior a, por ejemplo, traumatismos y partos, reacciones inmunes, inflamación, ciertas infecciones virales, ciertos trastornos plaquetarios, y cáncer. La coagulación intravascular diseminada es una complicación grave de muchas enfermedades y algunos tratamientos farmacológicos, incluyen, por ejemplo, heparina. El consumo trombótico de factores de coagulación y plaquetas y la coagulación sistémica da como resultado la formación de trombos que amenazan a la vida que se producen a lo largo de la microvasculatura, lo que lleva a hipoxia local o generalizada y al fallo orgánico.

Por lo tanto, también se desvela un método para inhibir la trombosis en un sujeto que lo necesite administrando al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz (o una dosis inhibitoria) de un anticuerpo monoclonal anti-factor XI de la divulgación. En algunos ejemplos, la trombosis se asocia a (i) síndromes coronarios agudos, tal como infarto de miocardio, angina inestable, angina refractaria, trombo coronario oclusivo que se produce después de l terapia trombolítica o angioplastia poscoronaria; (ii) síndromes cerebrovasculares isquémicos, incluyendo ictus embólico, ictus trombótico, o ataques isquémicos transitorios; (iii) trombosis que se produce en el sistema venoso de forma espontáneamente o en el contexto de malignidad, traumatismo o cirugía, incluyendo tromboembolismo pulmonar; (iv) cualquier coagulopatía, incluyendo SDRA y CID, por ejemplo, en el contexto de la sepsis u otra infección, cirugía, embarazo, traumatismo o malignidad y si se asocia o no a un fallo multiorgánico, púrpura trombocitopénica trombótica, tromboangitis obliterante o enfermedad trombótica asociada a trombocitopenia inducida por heparina; (v) complicaciones trombóticas asociadas a la circulación extracorpórea (por ejemplo, diálisis renal, derivación cardiopulmonar u otro procedimiento de oxigenación, y plasmaféresis); (vi) complicaciones trombóticas asociadas a la instrumentación (tal como cateterización cardíaca u otra intravascular, bomba de balón intraaórtica, endoprótesis coronaria, válvula cardíaca, máquinas de diálisis, bombas y oxigenadores); (vii) complicaciones asociadas al ajuste de dispositivos protésicos; y (ix) material trombogénico extraño en la circulación (natural o artificial), tales como de procedimientos quirúrgicos, trasplante de órgano / tejido / célula (por ejemplo, reacción de injerto contra huésped), o

implantes.

Los agentes antitrombóticos tradicionales pueden tener efectos secundarios negativos e incluso ser fatales, cuando se administran a sus dosis máximas eficaces. En consecuencia, se desvela un método para reducir una dosis requerida o complementar el efecto de un agente antitrombótico en el tratamiento de la trombosis en un sujeto que lo necesite, administrando al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-fXI de la divulgación.

Los agentes antitrombóticos incluyen, por ejemplo, Inhibidores directos o indirectos de la trombina, inhibidores del factor X (fX), inhibidores del factor IX (FIX), inhibidores del factor XII (fXII), inhibidores del factor V (fV), inhibidores del factor VIII (fVIII), inhibidores del factor XIII (fXIII), inhibidores del factor VII (fVII), inhibidores del factor tisular, agentes profibrinolíticos, agentes fibrinolíticos, inhibidores de la carboxipeptidasa B, inhibidores plaquetarios, agentes reductores selectivos del recuento de plaquetas, o inhibidores de fXI. Los inhibidores directos de la trombina incluyen argatrobán y sus derivados o análogos, hirudina y derivados recombinantes o sintéticos o análogos de los mismos, derivados del tripéptido Phe-Pro-Arg, derivados de la clorometilcetona, ximelagatrán y derivados, metabolitos, o análogos de los mismos, inhibidores del exosítio de unión a aniones, y aptámeros de ARN / ADN. Los inhibidores de trombina indirectos incluyen heparina, cumarina, dermatán, y trombomodulina. Los inhibidores de fX incluyen inhibidores directos de fXa, rivaroxabán, anticuerpos contra fX, fXa inactivado, o análogos y derivados de los mismos.

Los inhibidores de fIX incluyen anticuerpos contra fIX, inhibidores directos de fIXa o fIXa inactivado, o análogos y derivados de los mismos. Los inhibidores del fXII incluyen inhibidores directos de fXII, inhibidores de la tripsina de maíz, anticuerpos contra fXII, o fXIIa inactivado o análogos y derivados de los mismos. Los inhibidores del factor V incluyen anticuerpos contra fV, proteína C activada, proteína S, o análogos y derivados de los mismos. Los inhibidores del factor VIII incluyen anticuerpos contra el fVIII, proteína C activada, proteína S, o análogos y derivados de los mismos. Los inhibidores del factor XIII incluyen anticuerpos contra fXIII, inhibidores directos de fXIIIa, o fXIIIa inactivado. Los inhibidores del factor VII incluyen anticuerpos contra el fVII, inhibidor de la vía del factor tisular, fVIIa inactivado, o inhibidor directo del factor VIIa o análogos y derivados de los mismos. Los inhibidores del factor tisular incluyen el inhibidor de la vía del factor tisular, anticuerpos contra el factor tisular, o análogos y derivados de los mismos. Los agentes profibrinolíticos incluyen uroquinasa, estreptocinasa, activador de plasminógeno tisular o derivados de los mismos. Los agentes fibrinolíticos incluyen plasmina, microplasmina, ancrod o derivados de los mismos. Los inhibidores de plaquetas incluyen aspirina, clopidogrel, dipiridamol o derivados de los mismos. Los agentes reductores selectivos del recuento de plaquetas incluyen hidroxiurea, anagrelida o derivados de los mismos. Los inhibidores del factor XI incluyen inhibidores directos de fXIa, otros anticuerpos contra fXI, fXIa inactivado, o análogos y derivados de los mismos.

En otro enfoque, se desvela un método para tratar cáncer metastásico en un sujeto que lo necesita administrando al sujeto una dosis farmacéuticamente eficaz (o una dosis inhibitoria) de un anticuerpo monoclonal anti-fXI de la divulgación. En otro enfoque más, se desvela un método para tratar una reacción inflamatoria aguda en un sujeto que lo necesita, administrando al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz (o una dosis inhibitoria) de un anticuerpo monoclonal anti-fXI de la divulgación. En otro enfoque, los anticuerpos frente fXI desvelados en el presente documento se pueden usar para tratar el líquido amniótico o la embolia de la médula ósea. En otro enfoque, los anticuerpos desvelados pueden usarse para tratar la anemia de células falciformes o la hemólisis. Además, se desvela un método para tratar la glomerulonefritis aguda en un sujeto que necesita tratamiento, administrando al sujeto un anticuerpo específico de fXI de la divulgación. También se desvela un método para tratar la retinopatía diabética en un sujeto que necesita tratamiento administrando al sujeto un anticuerpo anti-fXI descrito en el presente documento.

En enfoques adicionales, se desvelan terapias de combinación en las que un anticuerpo monoclonal anti-fXI es el agente activo principal y se administra junto con un agente activo adicional a un sujeto que lo necesite. Dicha terapia de combinación se puede llevar a cabo mediante la administración de los diferentes agentes activos en una única composición, por administración concurrente de los diferentes agentes activos en diferentes composiciones o por administración secuencial de los diferentes agentes activos. La terapia de combinación también puede incluir situaciones en las que el anticuerpo monoclonal anti-fXI ya se está administrando al paciente y el agente activo adicional se debe añadir al régimen farmacológico del paciente, así como también cuando a diferentes individuos (por ejemplo, médicos u otros profesionales médicos) se administran los componentes separados de la combinación al paciente. El agente activo adicional generalmente, aunque no necesariamente, es uno que sea eficaz en la inhibición de la trombosis. En algunos enfoques, el agente activo adicional es un agente hemostático (es decir, un agente que promueve la hemostasia). En ejemplos particulares, los agentes hemostáticos utilizados en las terapias de combinación incluyen el factor VII activado (fVIIa) o el concentrado del complejo de protrombina activada (APCC). El ingrediente activo clave del APCC es la protrombina, que contribuye tanto a la hemostasia como al crecimiento del trombo. Por el contrario, se cree que el aumento de la concentración plasmática de fVIIa aumenta la generación de trombina predominantemente a través de una vía dependiente del factor tisular (TF) en la que el complejo TF / fVIIa activa los factores IX y X.

En enfoques concretos, el método de inhibición de la activación de fXI por el factor XIIa (fXIIa) en un sujeto

- comprende (a) seleccionar un sujeto que necesita tratamiento; y (b) administrar al sujeto una cantidad inhibitoria de un anticuerpo monoclonal, inmunoconjugado o la composición desvelada en el presente documento. En algunos ejemplos, el sujeto que necesita tratamiento tiene o está en riesgo de desarrollar trombosis. En algunos ejemplos, el sujeto que necesita tratamiento es un sujeto que sufre o tiene riesgo de sufrir un infarto de miocardio, ictus isquémico, tromboembolismo pulmonar, coagulación intravascular diseminada, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica grave, cáncer metastásico o una enfermedad infecciosa. En algunos ejemplos, el sujeto que necesita tratamiento es un sujeto con activación patológica de fXI. En algunos ejemplos, la cantidad inhibitoria del anticuerpo monoclonal, inmunoconjugado o composición es una cantidad suficiente para inhibir la activación de fXI en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 %. En ejemplos particulares, la cantidad inhibitoria del anticuerpo monoclonal, inmunoconjugado o composición es una cantidad suficiente para inhibir la activación de fXI en un 90-100 %. El anticuerpo, inmunoconjugado o composición pueden administrarse utilizando cualquier vía de administración adecuada y cualquier dosis o programa de dosificación adecuados, como se ha analizado anteriormente.
- Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características particulares y/o realizaciones. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la divulgación a las características particulares o realizaciones descritas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación, Secuenciación y caracterización del anticuerpo monoclonal específico para fXI 14E11

Este ejemplo describe la producción y secuenciación de un anticuerpo monoclonal específico para fXI que bloquea la interacción de fXI con fXIa (véase la Figura 8).

Generación y secuenciación de 14E11.

Se produjo IgG 14E11 monoclonal contra fXI murino en un ratón deficiente en fXI. Para determinar las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la cadena ligera variable y la cadena pesada variable de 14E11, se clonaron V_L-C_L y V_H-C_{H1} a partir del hibridoma 14E11 de acuerdo con los procedimientos estándar. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de cadena ligera y cadena pesada variables se determinaron y se exponen a continuación y en el listado de secuencias como las SEQ ID NO: 1 -4. Los restos de CDR están subrayados y se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) de 14E11 (SEC ID NO: 1)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYLT
SYRNTGVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQQHYKTPYSEGGGTK
LERLR

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) de 14E11 (SEQ ID NO: 2)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAG
ACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGT
TGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACT
TGACATCCTACCGGAACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGG
ATCTGGGACGGATTTCACTTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGAC
CTGGCAGTTTACTACTGTCAGCAACATTATAAACTCCGTATTCGTTCCGG
AGGGGGGACCAAGCTGGAACGGTTACGG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) de 14E11 (SEQ ID NO: 3)

QVQLEESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYGIYWVRQPPGKGLEWLGMIW
GDGRTDYNSALKSRLSSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDTARYYCARDYYGS
KDYWGQGTTLTVSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) de 14E11 (SEQ ID NO: 4)

CAGGTGCAGCTGGAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGA
 GCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAACCGGCTATGGT
 ATATACTGGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAA
 TGATATGGGGTGATGGAAGAACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAG
 ACTGAGCATCAGTAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTTCTTAAAAATG
 AACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCAGGTACTACTGTGCCAGAGATT
 ACTACGGTAGTAAGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC
 CTCA

Tabla 1. Localizaciones de las CDR en las V_L y V_H de 14E11

Cadena	CDR	Restos	SEQ ID NO:
V _L	CDR1	24-34	1
V _L	CDR2	50-63	1
V _L	CDR3	91-98	1
V _H	CDR1	31-35	3
V _H	CDR2	50-68	3
V _H	CDR3	98-105	3

5 *14E11 reconoce universalmente el fXI de mamífero*

La capacidad de 14E11 para unirse a fXI de diferentes especies de mamíferos se evaluó mediante inmunoprecipitación. El plasma se obtuvo de seres humanos, vacas, un caballo, cerdo, conejo, mapache, tigre, babuino, gato, pollo, perro, elefante africano y llama, y el suero se obtuvo de oso hormiguero. Se usó plasma de un sujeto humano deficiente en fXI como control negativo. Se recogió plasma o suero (500 µl) en citrato de sodio y se mezcló con 500 µl de Tris-HCl. El anticuerpo 14E11 se unió a Affigel-10 a 3 mg de IgG por ml de perlas. El plasma o suero diluido (1 ml) se inmunoprecipitó con 50 µl de perlas de 14E11 durante la noche a 4 °C. Las perlas se lavaron una vez con 1 ml de Tris-HCl, luego se eluyó con 50 µl de tampón de muestra de SDS no reductor. El eluato (1-10 µl) se pasó por geles de SDS al 7,5 % en condiciones no reductoras. Se realizaron transferencias Western de los geles usando 14E11 biotinilado como anticuerpo principal y estreptavidina-HRP como anticuerpo secundario.

Los resultados demuestran que el 14E11 reconoce el fXI de diversas especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, oso hormiguero, vacas, caballos, cerdos, conejos, mapache, tigres, babuinos, gatos, perros, elefantes y llamas (FIG. 9). Como cabía esperar, 14E11 no reconoció ninguna proteína en la muestra obtenida de un pollo porque las especies aviares no expresan fXI.

14E11 se une al dominio A2 de fXI

Para determinar a qué dominio del fXI se une 14E11 se generó una serie de construcciones quiméricas en las que los cuatro dominios manzana de fXI individuales (A1-A4) se intercambiaron con el dominio correspondiente de PK. Las proteínas quiméricas se separaron por electroforesis y se sometieron a inmunotransferencia con 14E11. Los resultados demostraron que 14E11 reconoció el fXI de tipo salvaje murino y humano, así como proteínas quiméricas que comprenden el dominio A1, A3 o A4 de fXI (véase la FIG. 10A). Sin embargo, 14E11 no reconoció la proteína quimérica que carecía del dominio A2 de fXI. Estos resultados indican que 14E11 se une a un epítipo presente en el dominio A2. Los dominios manzana de fXI individuales también se fusionaron con tPA para determinar si 14E11 es capaz de unirse a un dominio específico. Las proteínas de fusión se separaron por electroforesis y se sometieron a inmunotransferencia con 14E11. Los resultados demuestran que 14E11 se une al dominio A2, pero no se une a los dominios A1, A3 o A4 de fXI (FIG. 10B).

35 *Los animales tratados con 14E11 están protegidos de la oclusión de la arteria carótida*

El anticuerpo monoclonal 14E11 se evaluó en un modelo de trombosis de la arteria carótida murina. Los ratones C57B1 / 6 se trataron con 7,5 % o 10 % de FeCl₃ y se administró 14E11 por vía intravenosa o intraperitoneal. En ausencia de tratamiento con 14E11, todos los animales desarrollaron oclusiones después del tratamiento con cualquier concentración de FeCl₃ en 10 minutos. Sin embargo, ninguno de los ratones (10 de 10) tratados con 7,5 % de FeCl₃ y 14E11 desarrolló oclusión de la arteria carótida. Las inmunotransferencias para fXI demostraron que el tratamiento con 14E11 no reducía la cantidad de fXI presente en el plasma de los animales tratados. Este hallazgo es consistente con los datos presentados a continuación, lo que indica que el efecto antitrombótico de 14E11 es el resultado de prevenir la activación de fXI por fXIIa.

45 **Ejemplo 2: Inhibición de la formación de trombos en un modelo de trombosis en babuino**

El modelo de trombosis en babuino ha sido descrito previamente por Tucker *et al.* (Blood 113(4):936-944, 2009) y en

la publicación PCT n.º el documento WO 2009/067660. Los experimentos para evaluar la formación de trombo inducida por colágeno en presencia o ausencia de 14E11 se llevaron a cabo como se describe a continuación.

5 La formación de trombos se inició en derivaciones arteriovenosas crónicas en babuinos al interponer un injerto vascular protésico durante hasta 60 minutos de acuerdo con un procedimiento descrito previamente (Hanson *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92:2003 -2012, 1993). El injerto hipotrombogénico (politetrafluoroetileno expandido; W.L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ; Gruber y Hanson, *Blood* 102:953-955, 2003) se recubrió con colágeno, que desencadena de forma consistente la formación de trombos dependientes de plaquetas. Los segmentos de injerto de 20 mm de longitud (con diámetros internos de 2 o 4 mm) se llenaron con colágeno equino de tipo I (1 mg / ml; Nycomed
10 Arzeneimittel, Munich, Alemania) durante 15 minutos y luego se secó durante la noche bajo un flujo de aire estéril. Los injertos recubiertos de colágeno trombogénico se incorporaron luego entre segmentos de tubos de caucho de silicona, desplegado en las derivaciones y se expusieron después al flujo sanguíneo. El caudal a través del injerto se restringió a 100 ml / minuto (medido por el medidor de flujo de Transonics Systems, Ithaca, NY) pinzando el segmento de derivación proximal, con lo que se producen velocidades medias iniciales de cizallamiento de la pared de 265 s⁻¹ (4 mm de diámetro interno) o 2120 s⁻¹ (2 mm de diámetro interno). Los injertos se retiraron de las
15 derivaciones a los 60 minutos (injertos de 4 mm de diámetro interno) o cuando el caudal disminuyó de 100 ml / minuto a 20 ml / minuto (injertos de 2 mm de diámetro interno) señalizando una oclusión inminente. El tiempo desde el inicio del flujo de sangre a través del injerto hasta que el flujo alcanzó 20 ml / minuto se tomó como el tiempo de oclusión.

20 La formación de trombos se evaluó en tiempo real durante los experimentos mediante imágenes de cámara gamma cuantitativa de la acumulación de plaquetas radiomarcadas dentro del segmento de balsa, y mediante determinaciones de punto final del depósito de fibrinógeno / fibrina radiomarcado, como se ha descrito anteriormente (Hanson *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92:2003 -2012, 1993). Las mediciones de la radiactividad asociada a las plaquetas en
25 los injertos se registraron utilizando una cámara de centelleo gamma 400T de General Electric (Milwaukee, WI) interconectada con un sistema informático InteCam de NuQuest (MECX, Arlington Heights, IL). Los eventos embólicos se registraron como disminuciones bruscas en el número de plaquetas en el injerto entre los marcos de imagen posteriores.

30 Los animales fueron tratados con vehículo, aspirina, anticuerpo monoclonal O1A6 (descrito en Tucker *et al.*, *Blood* 113(4):936-944, 2009; y en la publicación PCT N.º WO 2009/067660), o anticuerpo monoclonal 14E11. De acuerdo con los resultados anteriores, el tratamiento con O1A6 redujo la deposición de plaquetas y fibrina en injertos vasculares recubiertos con colágeno de 4 mm de diámetro interno. En contraste, el tratamiento con 14E11 no alteró
35 significativamente la deposición de plaquetas o fibrina en los injertos recubiertos con colágeno. Sin embargo, la administración de 14E11 redujo significativamente la deposición de plaquetas en un trombo de cola en propagación.

El bloqueo del trombo de la cola en propagación sin afectar significativamente a la deposición de plaquetas en el injerto trombogénico es un resultado que caracteriza a los agentes anti-trombóticos eficaces, tales como heparina a dosis alta. Por lo tanto, los resultados desvelados en el presente documento indican que 14E11 es un potente
40 agente anti-trombótico en primates.

Ejemplo 3: Materiales y métodos

45 Este ejemplo describe los reactivos, ensayos y métodos utilizados en los estudios descritos en el Ejemplo 4.

Reactivos

El plasma deficiente en fXII era de George King Bio-Medical, Inc. El plasma deficiente en fXI, fXIa, factor Xa (fXa), α -trombina y fXI fueron de Hematologic Technologies. El factor tisular recombi-plastina era de Instrument Laboratories.
50 El fXIIa y el inhibidor de la tripsina del maíz (CTI) eran de Enzyme Research Laboratories. La hirudina recombinante (lepirudina) era de Bayer. S-2366 (L-piro-glutamil-L-prolil-L-arginina-p-nitroanilida) era de DiaPharma. Z-Gly-Gly-Arg-AMC era de Bachem. Dioleoilfosfatidilcolina:dioleoilfosfatidilserina (7:3 p/p) era de Avanti Polar Lipids. El reactivo STA PTT Automate 5 era de Diagnostic Stago. La seroalbúmina bovina (BSA), la cefalina de cerebro de conejo (RBC) y el diisopropilfluorofosfato (DFP) eran de Sigma-Aldrich. Los calibradores de trombina- α 2-macroglobulina
55 para los ensayos de generación de trombina eran de Thrombinoscope (Maastricht, Países Bajos).

Expresión y purificación del factor XI recombinante

60 El fXI humano recombinante se expresó en células HEK 293, como se ha descrito previamente (Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373-36378, 1999). Los ADNc expresados fueron para (1) fXI de tipo salvaje (fXI^{WT}), (2) fXI con la Lys⁸³ y la Gln⁸⁴ sustituidas con alanina (fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴), (3) fXI con la Ser¹⁹⁵, la Asn¹⁹⁶ y la Ile¹⁹⁷ sustituidas con alanina (fXI-Ala¹⁹⁵⁻¹⁹⁷) y (4) fXI con la Ser⁵⁵⁷ sustituida con alanina (fXI-Ala⁵⁵⁷). El fXI se purificó a partir de medios condicionados (Cellgro Complete) mediante cromatografía utilizando la IgG1 anti-factor XI humano G5.12 (Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373 -36378, 1999). La proteína se eluyó con tiocianato sódico 2 M en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM
65 (Tris / NaCl), concentrada por ultrafiltración, se dializó contra Tris / NaCl, y se almacenó a -80 °C. El fXI (aproximadamente 200 μ g / ml) se convirtió en fXIa por incubación con 2 μ g / ml de fXIIa a 37 °C. El fXIa se separó

del fXIIa volviéndolo a aplicar a la columna de afinidad 1G5.12.

Caracterización del factor XI recombinante.

- 5 Las variantes de fXI fXI^{WT} y fXI se diluyeron a 5 µg / ml en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, Se prepararon BSA al 0,1 % (TBSA) y diluciones en serie 1:2 de cada proteína. Cada dilución (65 µl) se mezcló con volúmenes iguales de plasma deficiente en fXI y reactivo STA PTT Automate 5 (Diagnostic Stago) y se incubó durante cinco minutos a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 65 µl de CaCl₂ 25 mM y se determinó el tiempo de formación del coágulo en un fibrómetro Dataclot II (Helena Laboratories). Los resultados para 5 µg / ml de fXI^{WT} se designaron con una actividad del 100 %. La actividad específica de fXI^{WT} fue similar a la del fXI plasmático (aproximadamente 200 unidades / mg, con 1 unidad que representa la actividad del fXI en 1 ml de plasma normal). Los resultados para las diluciones de fXI se representaron en función del tiempo de coagulación y las actividades específicas se determinaron en relación con el fXI^{WT}. Las actividades del fXIa en plasma se compararon mediante la adición de 65 µl de diluciones seriadas de proteasa a volúmenes iguales de plasma deficiente en fXI y RBC. Después de 30 segundos, se añadieron 65 µl de CaCl₂ 25 mM y se determinó el tiempo de formación de coágulos. Las actividades de fXIa se determinaron en relación con 5 µg / ml de fXIa^{WT} (se le asignó un valor del 100 %).

- 20 fXI^{WT} y fXI-Ala⁶³⁻⁸⁴ se diluyeron a 25 nM en TBSA con 5 nM de fXIIa o 15 nM de α-trombina a 37 °C. A intervalos de 10 minutos, se retiraron alícuotas de 50 µl y se suplementaron con CTI 750 µM (para fXIIa) o lepirudina 150 µM (para α-trombina) para terminar la activación. Las muestras se mezclaron con volúmenes iguales de TBSA que contenían S-2366 1 mM y se siguieron los cambios en la DO a 405 nm en un lector de placas de microtitulación SpectraMAX (Molecular Devices). La concentración de fXIa se determinó por comparación con una curva estándar construida con fXIa puro. En algunas reacciones, se incluyeron anticuerpos monoclonales para fXI.

- 25 *Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-fXI O1A6 y 14E11 murinos*

- Se produjo IgG O1A6 monoclonal murino contra fXI humano (Tucker *et al.*, *Blood* 113(4):936-944, 2009). El anticuerpo prolonga el tiempo de coagulación del plasma humano (IC99 de aproximadamente 10 nM) en un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial (PTT). La IgG monoclonal 14E11 se generó en un ratón Balb-C deficiente en fXI contra fXI murino recombinante (Gailani *et al.*, *Blood* 90:1055 -1064, 1997). Este anticuerpo prolonga el PTT del plasma humano y de ratón. Se ha descrito la preparación de fXI humano recombinante, precalicreína y quimeras de fXI / PK (Sun and Gailani, *J. Biol. Chem.* 271:29023 -29028, 1996). Se realizaron transferencias Western de proteínas recombinantes fraccionadas en tamaño en geles de SDS-poliacrilamida al 10 % utilizando O1A6 o 14E11 como el anticuerpo de detección principal y quimioluminiscencia para la detección. El efecto de O1A6 y 14E11 sobre la activación de fXI se probó utilizando el ensayo cromogénico descrito anteriormente.

Aislamiento de plaquetas a partir de sangre humana

- 40 La sangre se extrajo de voluntarios sanos en una décima parte de citrato ácido de dextrosa anticoagulante, seguido de sedimentación a 200 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó plasma rico en plaquetas (PRP) del sedimento. Las plaquetas se sedimentaron en presencia de 1 U / ml de Apyrase de calidad VII (Sigma) a 800 g durante 20 minutos, se resuspendieron en tampón Tyrode (Hepes 15 mM, pH 6,5, NaCl 125 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM, dextrosa 5,6 mM, BSA al 0,35 %), y se pasó por una columna de exclusión por tamaño Sepharose 4B (Sigma) (Baglia *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:6734 -6740, 1995). Después de centrifugar a 800 g durante 20 minutos, las plaquetas se resuspendieron en tampón Tyrode a pH 7,4 y se contaron en un instrumento de hematología multiespecie Hemavet HV950FS (Drew Scientific).

Ensayo de generación de trombina

- 50 La generación de trombina se determinó midiendo la escisión del sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC a 37 °C en un Thrombinoscope® (Mastricht, Países Bajos), utilizando los calibradores internos de α-trombina / α2-macroglobulina suministrados por el fabricante (Hemker *et al.*, *Thromb. Haemost.* 83:589 -591, 2000; De Smedt *et al.*, *Thromb. Haemost.* 100:343 -349, 2008). Los estudios de generación de trombina se realizaron en placas de 96 pocillos (Immulon 2HB, Thermo Scientific, Waltham, MA). Antes de usarse, los pocillos se recubrieron añadiendo 200 µl de 10 mg / ml de PEG 20000 seguido de incubación durante la noche a temperatura ambiente. Después de la eliminación de la solución de bloqueo, las placas se calentaron en un horno durante la noche a 65 °C. Antes de usar en ensayos CAT, todas las preparaciones de plasma y fXI recombinante (0,7-1,9 µM en Tris / NaCl) se trataron con un exceso molar de 1000 veces de DFP durante 30 minutos, a temperatura ambiente, seguido de diálisis contra Tris / NaCl.

- 60 El uso de plasmas de diferentes donantes y diferentes flebotomías del mismo donante puede introducir una variación significativa en los ensayos de generación de trombina. Por lo tanto, los experimentos se realizaron utilizando lotes únicos de plasma deficiente en fXI o fXII. Los plasmas se suplementaron con 50 µg / ml de CTI y Z-Gly-Gly-Arg-AMC HCl 415 µM, concentraciones finales. El plasma deficiente en fXI se suplementó con fXI (30 nM) o vehículo. El plasma deficiente en fXII se suplementó con IgG O1A6 o 14E11 (300 nM) o vehículo y se incubó durante 30 minutos en hielo antes de usar. La adición de suplementos dio como resultado una dilución < 10 % del plasma original.

En cada placa de microtitulación, se mezclaron 80 μ l de plasma suplementado con 20 μ l de tampón Tyrode a pH 7,4 que contenía vesículas de fosfatidicolina / fosfatidilserina (30 μ M) o plaquetas filtradas en gel (600.000 / mm^3) y cualquiera de los factores tisulares (0,96-9,6 pM), α -trombina (30-300 nM), fXa (36-180 pM) o fXIIa (0,6-6 nM). Las concentraciones finales son 5 μ M para las vesículas de fosfatidicolina / fosfatidilserina, 100.000/ mm^3 de plaquetas, TF 0,16-1,6 pM, α -trombina 5-50 nM, fXa 6-30 pM o fXIIa 0,1-1 nM. Para los controles, se mezclaron 80 μ l de plasma suplementado con 20 μ l de calibrador. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 20 μ l de HEPES 20 mM pH 7,4, CaCl_2 100 mM, BSA al 6 %, utilizando el sistema de inyección del Thrombinoscope, y se monitorizó la fluorescencia (excitación λ 390 nM, emisión λ 460 nM). La generación de trombina se determinó utilizando el software de análisis Thrombinoscope®, versión 3.0. El área bajo las curvas de generación de trombina se denomina potencial endógeno de trombina (ETP).

Ejemplo 4: El factor XI contribuye a la generación de trombina en ausencia del factor XII

15 *Generación de trombina dependiente de fXI en plasma deficiente en fXI suplementado con fXI de plasma.*

La contribución del fXI a la coagulación se evaluó midiendo la escisión mediada por trombina de un sustrato fluorogénico, como se ha descrito anteriormente (Hemker *et al.*, *Thromb. Haemost.* 83:589 -591, 2000; De Smedt *et al.*, *Thromb. Haemost.* 100:343 -349, 2008). Los estudios iniciales se realizaron en plasma deficiente en fXI suplementado con CTI, un inhibidor de la tripsina que se une e inhibe de forma selectiva fXII y fXIIa en plasma (Hemker *et al.*, *Thromb. Clin. Med.* 105:625 -628, 1985). Se probaron diferentes fuentes de plasma deficiente en fXI, incluyendo plasma de un paciente homocigoto para una mutación nula en el gen fXI. Todos los plasmas probados dieron resultados similares y estudios posteriores utilizaron una única fuente de plasma. fXI se añadió inmediatamente antes de la adición de calcio y un iniciador de la coagulación (TF, α -trombina o fXa). Cuando no se incluyó CTI, se observó generación de trombina en algunas (aunque no todas) reacciones sin un iniciador, consistente con la activación del fXI por el fXIIa. Además, algunas preparaciones de fXI promovieron la generación de trombina en ausencia de un iniciador, incluso cuando había CTI presente. Esto es consistente ya sea con la contaminación por fXIa del fXI, o la inhibición incompleta de fXIIa por CTI. Para eliminar la actividad del fXIa del fXI, las proteínas fueron tratadas con DFP, que inhibe irreversiblemente el fXIa al reaccionar con la serina del sitio activo. Cuando se añadió fXI tratado con DFP a plasma deficiente en fXI con CTI, la generación de trombina no se observó después de la recalcificación en ausencia de un iniciador durante un período de 2 horas. Estos resultados indican que (1) se requiere CTI para prevenir la activación de fXI por fXIIa en este sistema y (2) el tratamiento con DFP reduce la contaminación por fXIa de las preparaciones de fXI lo suficiente como para evitar la generación de trombina independiente del iniciador. Basándose en estos resultados, Se incluyó CTI en todas las reacciones y todas las preparaciones de fXI se trataron con DFP antes de su uso.

Los ensayos que miden la generación de trombina o la resistencia del coágulo a la fibrinólisis son insensibles a fXI cuando las reacciones se inician con TF \geq 5 pM (von dem Borne *et al.*, *Thromb. Haemost.* 78:834 -839, 1997; Cawthorn *et al.*, *Blood* 91:4581-4592, 1998; Keularts *et al.*, *Thromb. Haemost.* 85:1060 -1065, 2001; Ghosh *et al.*, *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 19:577 -580, 2008). En el sistema descrito en el presente documento, la contribución de fXI a la generación de trombina no se observó hasta que el TF fue $<$ 1,6 pM (Figura 1A). A TF 0,23 pM, la dependencia de la generación de trombina en fXI se observa fácilmente (Figura 1B), y esta concentración se usó en experimentos posteriores. Los resultados de la figura 1C muestran que la generación de trombina en plasma tratado con TF 0,23 pM es significativamente mayor en presencia de fXI que en su ausencia (AUC 810 ± 174 y 180 ± 20 nM, respectivamente), mientras que a 1,6 pM la generación de trombina TF es similar en presencia y ausencia de fXI (AUC 1160 ± 79 y 1131 ± 78 nM, respectivamente). De acuerdo con esto, la generación de trombina se produjo antes y fue mayor en presencia de fXI, cuando las reacciones se iniciaron con factor Xa 6 pM (Figura 1D), pero no fue dependiente de fXI en las reacciones iniciadas por el factor Xa 30 pM (Figura 1D).

Estos hallazgos apoyan un modelo en el que una proteasa generada después de la adición de TF al plasma activa el fXI. El hecho de que esta proteasa puede ser trombina se apoya en la observación de que la adición de α -trombina 5 nM al plasma promueve la generación de trombina dependiente de fXI (Figura 1E). El iniciador de α -trombina, a esta concentración, no escinde el sustrato fluorogénico de manera significativa y la señal observada se debe a la activación de la protrombina endógena. De forma interesante, a diferencia de la situación con TF y factor Xa, un componente dependiente de fXI de la generación de trombina todavía es detectable incluso cuando se añaden grandes cantidades de α -trombina.

La generación de trombina requiere la activación del factor IX por el factor XIa

Se piensa que la contribución de fXIa a la hemostasia es en gran parte, si no exclusivamente, debida a su capacidad para activar el factor IX. Para confirmar la importancia de la activación del factor IX por fXIa en el modelo actual, el plasma deficiente en fXI se complementó con fXI recombinante, seguido de la adición de TF. Anteriormente, se mostró que el fXI de tipo salvaje (fXI^{WT}) y el fXI en plasma tienen actividades similares en diversos ensayos (Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373 -36378, 1999; Sun y Gailani, *J. Biol. Chem.* 271: 29023-29028, 1996). fXI^{WT} produjo consistentemente un pico de generación de trombina más alto que el fXI en plasma (compárense las Figuras 2A y 1C), aunque la generación de trombina total (AUC) fue sólo ligeramente mayor (1267 ± 20 frente a trombina $810 \pm$

174 nM, respectivamente). En los estudios actuales, el fXI^{WT} se activó más rápido que el fXI en plasma en sistemas purificados, quizá debido a las diferencias en la glicosilación, y posiblemente explicando las diferencias en las formas de las curvas de generación de trombina. Se compararon dos variantes de fXI que son activadores deficientes en el factor IX con fXI^{WT}. fXI-Ala¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ se activa normalmente, pero tiene una baja afinidad por el factor IX debido a las sustituciones de alanina en un sitio crítico en el dominio A3 (Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373-36378, 1999). En fXI-Ala⁵⁵⁷, la serina del sitio activo ha sido reemplazada por alanina (Aktimur *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:7981-7987, 2003). fXIa-Ala⁵⁵⁷, por lo tanto, carece de actividad enzimática y aún es capaz de unirse al factor IX (Aktimur *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:7981-7987, 2003). fXI-Ala¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ o fXI-Ala⁵⁵⁷ demostraron una actividad específica baja (<5 % de fXI^{WT}) en las formas de cimógeno (fXI) y activada (fXIa) en los ensayos de coagulación en plasma, y no avalaron la generación de trombina en un ensayo de CAT (AUC < 100 nM para ambas proteínas) (Figura 2A).

Mientras que algunos datos de sistemas purificados (Oliver *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:170-177, 1999) y plasma (Wielders *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1138-1142, 2004) indican que las plaquetas son necesarias para la activación y actividad de fXI independiente de fXII, un estudio reciente (Pedicord *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 12855-12860, 2007) no apoyó esta conclusión. Por lo tanto, se comparó la generación de trombina en presencia de fosfolípidos y plaquetas humanas (100.000/mm³), y no se observaron diferencias apreciables entre las dos reacciones (AUC 764 y trombina 699 nM, respectivamente para fXI^{WT}) (FIG. 2A y B). Se ha demostrado que el fXI se une a la glicoproteína 1b de plaquetas (GP1b) (Baglia *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:45470 - 45476, 2004). La inclusión de un anticuerpo que bloquea la GP1b no afectó a la generación de trombina en el ensayo CAT, de nuevo, de acuerdo con la premisa de que las plaquetas no son necesarias para la activación óptima de fXI en este sistema.

El factor XI-Ala⁸³⁻⁸⁴ en ensayos de coagulación de plasma y ensayos de generación de trombina

En este punto, los resultados apoyan un modelo en el que fXI es activado por una proteasa generada al principio de la coagulación, tal como trombina, estimulando posteriormente el fXIa la generación de trombina mediante la activación del factor IX. Sin embargo, hay que considerar otras posibilidades. Por ejemplo, el iniciador puede generar suficiente trombina para activar los factores V y VIII, permitiendo que los rastros de fXIa promuevan la generación de trombina a pesar de los intentos de eliminar el fXIa antes del inicio del ensayo. La generación de trombina se evaluó en plasma deficiente en fXI suplementado con fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴. Trabajos previos demostraron un sitio de unión para α -trombina en el dominio fXI A1 (Baglia y Walsh, *J. Biol. Chem.* 271:3652-3658, 1996). Un enfoque de mutagénesis de saturación determinó posteriormente que reemplazar la Lys⁸³ y la Gln⁸⁴ con alanina daba como resultado una afinidad 100 veces menor para la α -trombina en comparación con fXI^{WT}. En la solución, fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴ fue activado por fXIIa a aproximadamente el 65 % de la tasa de fXI^{WT}, pero solo en aproximadamente el 10 % de la tasa de fXI^{WT} por α -trombina (Figura 3A). En una activación de contacto iniciada el ensayo de coagulación, fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴ tenía 100-150 % de la actividad específica de fXI^{WT}, lo que indica que es activado por fXIIa y posteriormente activa el factor IX. El XI-Ala⁸³⁻⁸⁴ (fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴) previamente activado tuvo 70-100 % de la actividad de coagulación de fXIa^{WT}, confirmando la capacidad de la proteasa para activar el factor IX en plasma. En los ensayos de generación de trombina iniciados con α -trombina, el fXI-Ala⁸³⁻⁸⁴ no soportó bien la generación de trombina (AUC 111 nM) (Figura 3B), lo que concuerda con la premisa de que el fXI está activado por la trombina en este sistema.

Sensibilidad del ensayo CAT a fXIa

La robusta generación de trombina se detectó en plasma deficiente en fXI suplementado con fXIa hasta una concentración final de 30 pM (0,1 % de la concentración plasmática de fXI) (Figura 4A). A fXIa 3 pM, se observó retraso en la generación de trombina en algunos experimentos y no se observó con fXIa 0,3 pM. Por el contrario, en el plasma que contenía fXI tratado con DFP, fXIa 0,3 pM inició de forma reproducible la generación de trombina (Figura 4B, AUC de trombina 441 nM) comparable a la trombina α 5 nM (Figura 1E, trombina 549 \pm 178 nM). Se ha postulado que los resultados de la figura 4B se deben a la contaminación por fXIa del fXI utilizado para suplementar el plasma, al parecer, la contaminación debería ser suficiente para producir una concentración final de fXIa superior a 3 pM. Esa generación de trombina se observó después de añadir fXIa a una concentración muy por debajo de este umbral (0,3 pM), pero no en ausencia de la fXIa, es una evidencia convincente de que el fXIa se genera en el plasma después de la adición del iniciador. El tiempo para alcanzar el pico de generación de trombina fue mayor con fXIa 0,3 pM que con TF o α -trombina (compárense las figuras 4B, 1C y 1E), consistente con fXIa que genera una cantidad pequeña de trombina a través de la activación del factor IX, que luego convierte fXI en fXIa, dando como resultado una mayor descarga posterior de la trombina.

Generación de trombina en plasma deficiente en XII desencadenada por TF o trombina

Los resultados de los experimentos anteriores se verificaron en un segundo sistema utilizando plasma deficiente en fXII, donde el fXI endógeno no ha sido expuesto a fXIIa, de modo que se produce una prevención efectiva de la generación de fXIa mediada por activación de contacto durante la preparación del plasma. No se requiere fXI exógeno en este sistema, y se usó un anticuerpo contra fXI humano (O1A6) para generar el equivalente de un estado deficiente en fXI cuando se requiere. O1A6 prolonga notablemente el tiempo de coagulación del PTT del plasma humano normal (Tucker *et al.*, *Blood* 113(4):936-944, 2009; publicación de PCT n.º WO 2009/067660). Las quimeras recombinantes de fXI y la proteína PK relacionada (Sun y Gailani, *J. Biol. Chem.* 271: 29023-29028, 1996)

se usaron para localizar el sitio de unión para O1A6 al dominio A3 de fXI (Figura 5A). Estudios posteriores con un panel de mutantes fXI dirigidos al sitio mostraron que O1A6 se une o bloquea el acceso a los restos 183 a 197, que se requieren para la unión del factor IX (Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:36373 -36378, 1999).

5 Se observó generación de trombina en plasma deficiente en fXII al que se añadió TF 0,23 pM (Figura 6A) o α -trombina 5 nM (Figura 6B). Similar a los resultados con plasma deficiente en fXI, este proceso requiere fXI / fXIa, dado que la adición de O1A6 redujo la generación de trombina (Figuras 6A y 6B). Se logró un efecto similar eliminando del plasma deficiente en fXII el fXI mediante cromatografía de afinidad por anticuerpos (Gailani y Broze, *Blood* 82: 813-819, 1993), y la adición de nuevo de fXI tratado con DFP restauró la generación de trombina. Cuando se añadió al sistema una gran cantidad de α -trombina (50 nM), todavía se observó un componente dependiente de fXI de la generación de trombina. En la FIG. 6C., la señal inicial (que se apoya en la ordenada) se debe a la escisión del sustrato por la α -trombina exógena. Obsérvese que el pico posterior de la generación de trombina y su ausencia cuando se incluye O1A6 en la reacción. Los hallazgos apoyan la premisa de que el fXI se activa en los ensayos de plasma deficientes en fXII mediante trombina y contribuye a la generación posterior de trombina.

15 La sensibilidad del ensayo CAT en el sistema deficiente en fXII también se comparó con fXIIa. De forma interesante, el sistema era considerablemente menos sensible a fXIIa que a fXIa. Mientras que las concentraciones subpicomolares de fXIa estimulan la generación de trombina, se requerían concentraciones de fXIIa en el intervalo de 0,1 a 1 nM para producir de manera reproducible efectos similares (Figura 7A). La adición de CTI bloqueó completamente la generación de trombina iniciada por fXIIa. El anticuerpo 14E11, que se une al dominio A2 de fXI (Figura 5B) prolonga el tiempo de coagulación PTT del plasma murino y humano, pero no afecta a la coagulación inducida por fXIa, lo que indica que interfiere con la activación de fXI pero no con la actividad de fXIa. En la solución, 14E11 inhibe parcialmente la activación de fXIIa de fXI en la solución (Figura 5C), y redujo significativamente la generación de trombina iniciada por fXIIa (Figura 7A), pero no afectó a la generación de trombina desencadenada por TF o α -trombina (Figura 7B). De esta manera, de nuevo, apoya la noción de que la activación de fXI en este sistema no involucra al fXIIa.

Ejemplo 5: Tratamiento de un sujeto con trombosis mediante la administración de anticuerpo específico para fXI 14E11

30 Este ejemplo describe un método representativo para el tratamiento de un sujeto con trombosis mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal 14E11.

35 A un paciente diagnosticado con trombosis se le administra aproximadamente 1 mg / kg de 14E11 en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo se administra por vía intravenosa mediante inyección en bolo. El paciente puede recibir una dosis única o pueden administrarse dosis adicionales según sea necesario. La dosis de 14E11 también puede modificarse según sea necesario dependiendo de la gravedad de la enfermedad, así como la edad, el peso y la salud general del sujeto. Un experto puede determinar una dosis y un programa de administración adecuados.

Ejemplo 6: Tratamiento del cáncer metastásico con anticuerpo monoclonal 14E11

Este ejemplo describe un método representativo para el tratamiento de un sujeto con cáncer metastásico.

45 Un paciente diagnosticado con cáncer metastásico (tal como, aunque no de forma limitativa, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer pancreático o melanoma) se administra un tratamiento primario, tal como radioterapia o quimioterapia. Al paciente se le administra además el anticuerpo monoclonal específico para fXI 14E11 como terapia complementaria. 14E11 se puede administrar antes de al mismo tiempo, o después del tratamiento primario. Asimismo, 14E11 puede administrarse en una sola dosis o repetirse según sea necesario para tratar el cáncer metastásico (por ejemplo, reducir el tamaño del tumor, ralentizar el crecimiento del tumor o inhibir otras metástasis). Por lo general, 14E11 se administra por vía intravenosa mediante inyección en bolo, pero puede administrarse utilizando cualquier otra vía de administración apropiada, en parte, en función del cáncer que se va a tratar. Un experto puede determinar una dosis apropiada de 14E11, pero generalmente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg / kg.

Ejemplo 7: Tratamiento de la enfermedad por descompresión mediante administración de 14E11

Este ejemplo describe un método representativo para el tratamiento de una enfermedad por descompresión del sujeto.

60 Un paciente que sufre de enfermedad por descompresión está siendo tratado con un tratamiento primario estándar, tal como la exposición a oxígeno al 100 % o con terapia de oxígeno hiperbárico. Al paciente se le administra además el anticuerpo monoclonal específico para fXI 14E11 como terapia complementaria. 14E11 se puede administrar antes de al mismo tiempo, o después del tratamiento primario. Asimismo, 14E11 puede administrarse en una sola dosis o repetirse según sea necesario para tratar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad por descompresión. Por lo general, 14E11 se administra por vía intravenosa mediante inyección en bolo, pero puede

administrarse utilizando cualquier otra vía de administración apropiada. Un experto puede determinar una dosis apropiada de 14E11, pero generalmente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg / kg. En algunos casos, Si el paciente padece una forma leve de enfermedad por descompresión, el paciente puede renunciar al tratamiento con oxígeno al 100 % y / o al tratamiento con oxígeno hiperbárico y recibir 14E11 como tratamiento primario.

5

Listado de secuencias

- 10 <110> OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY
VANDERBILT UNIVERSITY
Gruber, Andras
Tucker, Erik I.
David, Gailani
- 15 <120> ANTICUERPOS ANTI-FXI Y MÉTODOS DE USO

<130> 899-84198-02
- 20 <150> US 61/138,590
<151> 18/12/2008

<160> 4
- 25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Cadena ligera variable de inmunoglobulina
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(34)
<223> CDR1
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(63)
<223> CDR2
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (91)..(98)
<223> CDR3
- 50 <400> 1

ES 2 720 594 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Arg Leu Arg
 100 105

5

<210> 2
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cadena ligera variable de inmunoglobulina

15

<400> 2
 gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgttg cctggatatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaactact gatttacttg acatcctacc ggaacactgg agtcctgat 180
 cgcttactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttacta ctgtcagcaa cattataaaa ctccgtattc gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaacgggtt acgg 324

20

<210> 3
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cadena pesada variable de inmunoglobulina

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(35)
 <223> CDR1
 <220>

ES 2 720 594 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(68)
 <223> CDR2

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(105)
 <223> CDR3

10 <400> 3

```

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
          20           25           30

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50           55           60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115
  
```

15 <210> 4
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cadena pesada variable de inmunoglobulina

<400> 4

```

caggtgcagc tggaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc      60
acatgcaccg tctcagggtt ctcatcattacc ggctatggta tatactgggt tcgccagcct      120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggggtg atggaagaac agactataat      180
tcagctctca aatccagact gagcatcagt aaggacaact ccaagagcca agttttctta      240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccagggtact actgtgccag agattactac      300
ggtagtaagg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca      348
  
```

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el factor de coagulación XI (fXI) y que se une al fXI de manera competitiva con el anticuerpo que tiene la cadena ligera variable (V_L) de la SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada variable (V_H) de la SEQ ID NO: 3, en el que:
5 la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo monoclonal comprende CDR1, CDR2 y CDR3 cada una con los respectivos aminoácidos 24-34, 50-63 y 91-98 de la SEQ ID NO: 1 y la cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo monoclonal comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con los respectivos aminoácidos 31-35, 50-68 y 98-105 de la SEQ ID NO: 3.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de la V_L es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de la V_L comprende la SEQ ID NO: 1.
4. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de la V_L consiste en la SEQ ID NO: 1.
- 20 5. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia de aminoácidos de V_H es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.
6. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia de aminoácidos de la V_H comprende la SEQ ID NO: 3.
- 25 7. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia de aminoácidos de la V_H consiste en la SEQ ID NO: 3.
8. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 30 9. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)'₂, una proteína Fv monocatenaria (scFv), o una proteína Fv estabilizada con disulfuro (dsFv).
- 35 10. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo es una IgG.
- 40 11. Un inmunoconjugado aislado que comprende el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un compañero de fusión.
12. El inmunoconjugado aislado de la reivindicación 11, en el que el compañero de fusión es una molécula efectora, una etiqueta o un polipéptido heterólogo.
- 45 13. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o el inmunoconjugado de la reivindicación 11 o la reivindicación 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 50 15. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 14, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la V_L del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 2.
16. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la V_H del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 4.
- 55 17. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, operativamente unida a un promotor.
- 60 18. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17.
19. Una célula huésped aislada transformada con la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17.
- 65 20. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el inmunoconjugado de la

reivindicación 11 o la reivindicación 12 o la composición de la reivindicación 13, para su uso en un método para prevenir o tratar trombosis o tromboembolismo en un sujeto, que comprende: (a) seleccionar un sujeto que necesita tratamiento; y (b) administrar al sujeto una cantidad inhibitoria del anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición, en donde la composición inhibe la activación de fXI por el factor XIIa (fXIIa) en el sujeto.

5 21. El anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el sujeto que necesita tratamiento es un sujeto con activación patológica del fXI.

10 22. El anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición para su uso según la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en donde en el método la cantidad inhibitoria del anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición es una cantidad suficiente para inhibir la activación del fXI en al menos un 50 %.

15 23. El anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-22, en donde en el método el anticuerpo, el inmunoconjugado o la composición se administran al sujeto mediante administración parenteral.

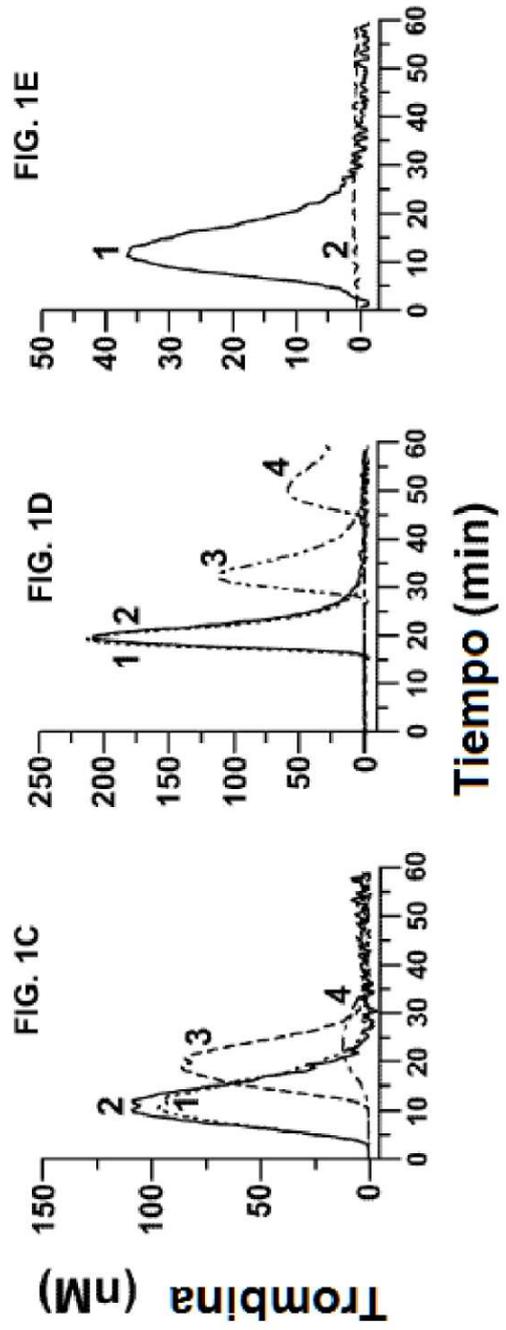
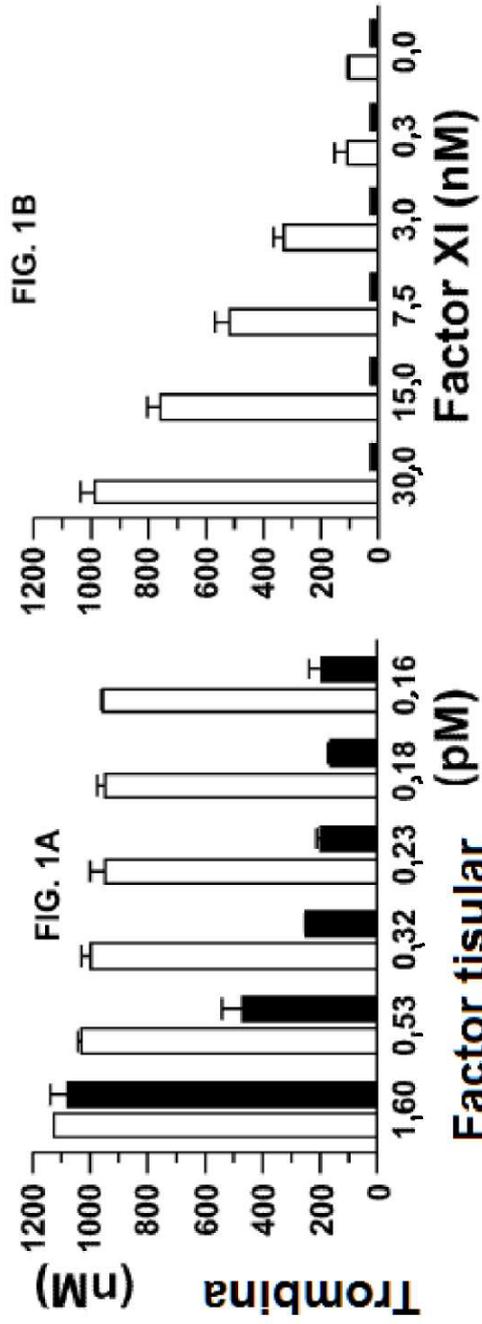
24. El anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde en el método el anticuerpo, el inmunoconjugado o la composición se administran mediante inyección.

20 25. El anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-24, en donde en el método el anticuerpo, el inmunoconjugado o la composición se administran diariamente o cada dos semanas.

25 26. El anticuerpo monoclonal, el inmunoconjugado o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde en el método, el anticuerpo se administra a una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg / kg.

30 27. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el inmunoconjugado de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, o la composición de la reivindicación 13 en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la trombosis o el tromboembolismo.

35 28. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el inmunoconjugado de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, o la composición de la reivindicación 13 para su uso en un método para prevenir o tratar trombosis o tromboembolismo.



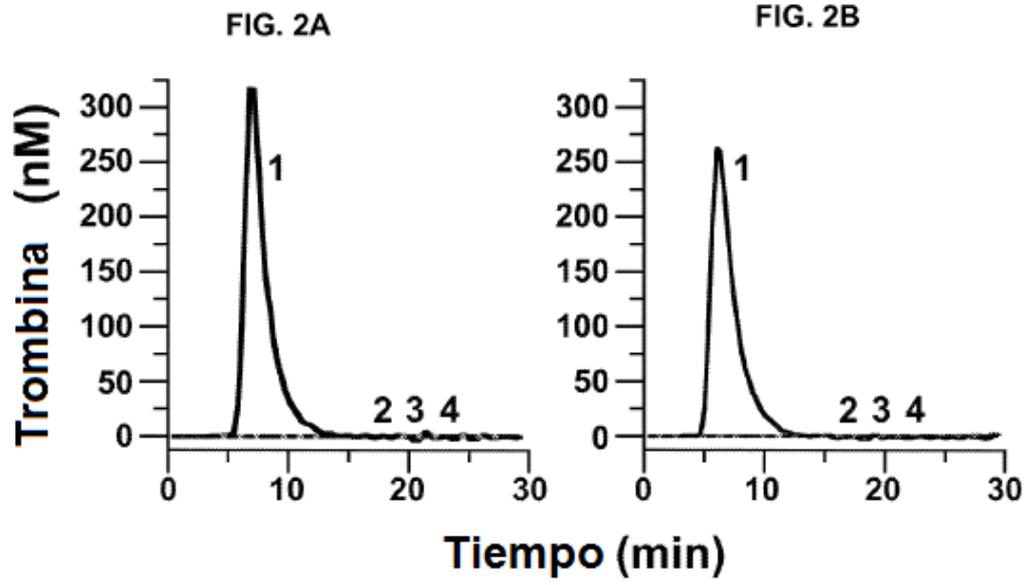


FIG. 3A

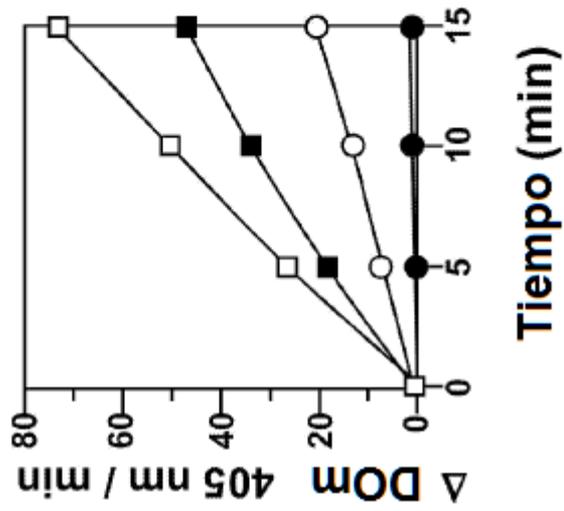


FIG. 3B

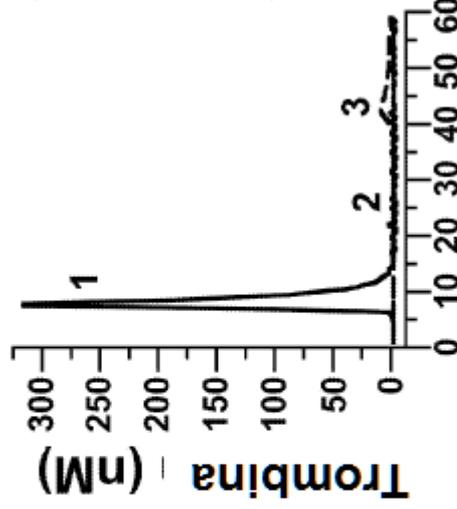
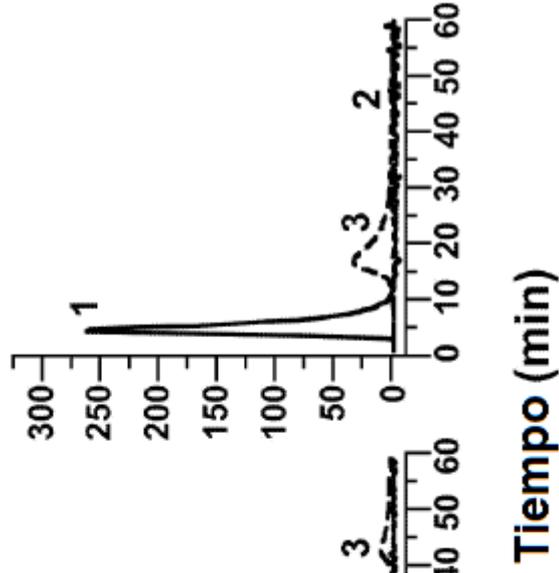


FIG. 3C



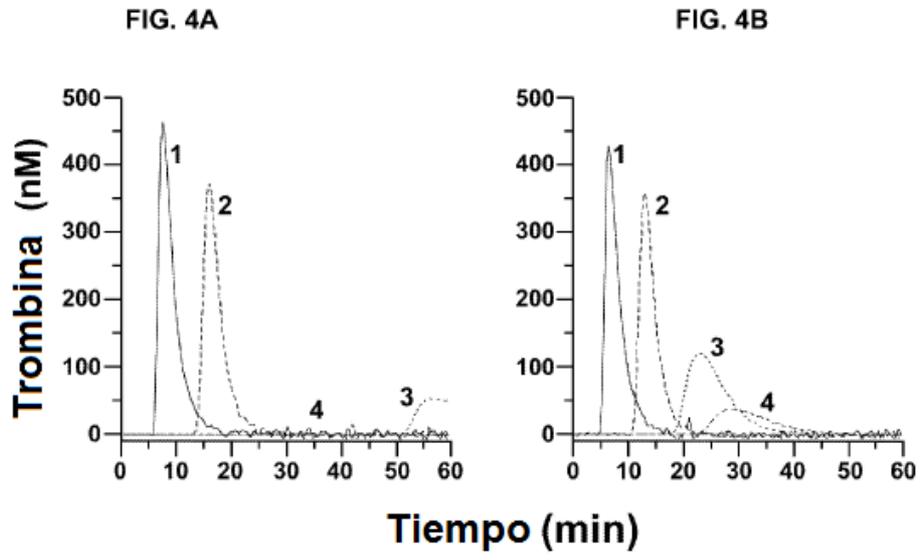


FIG. 5C

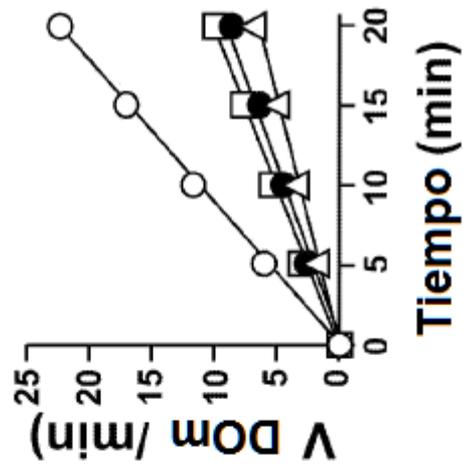
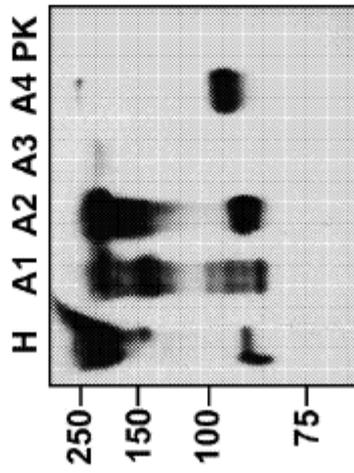


FIG. 5B



FIG. 5A



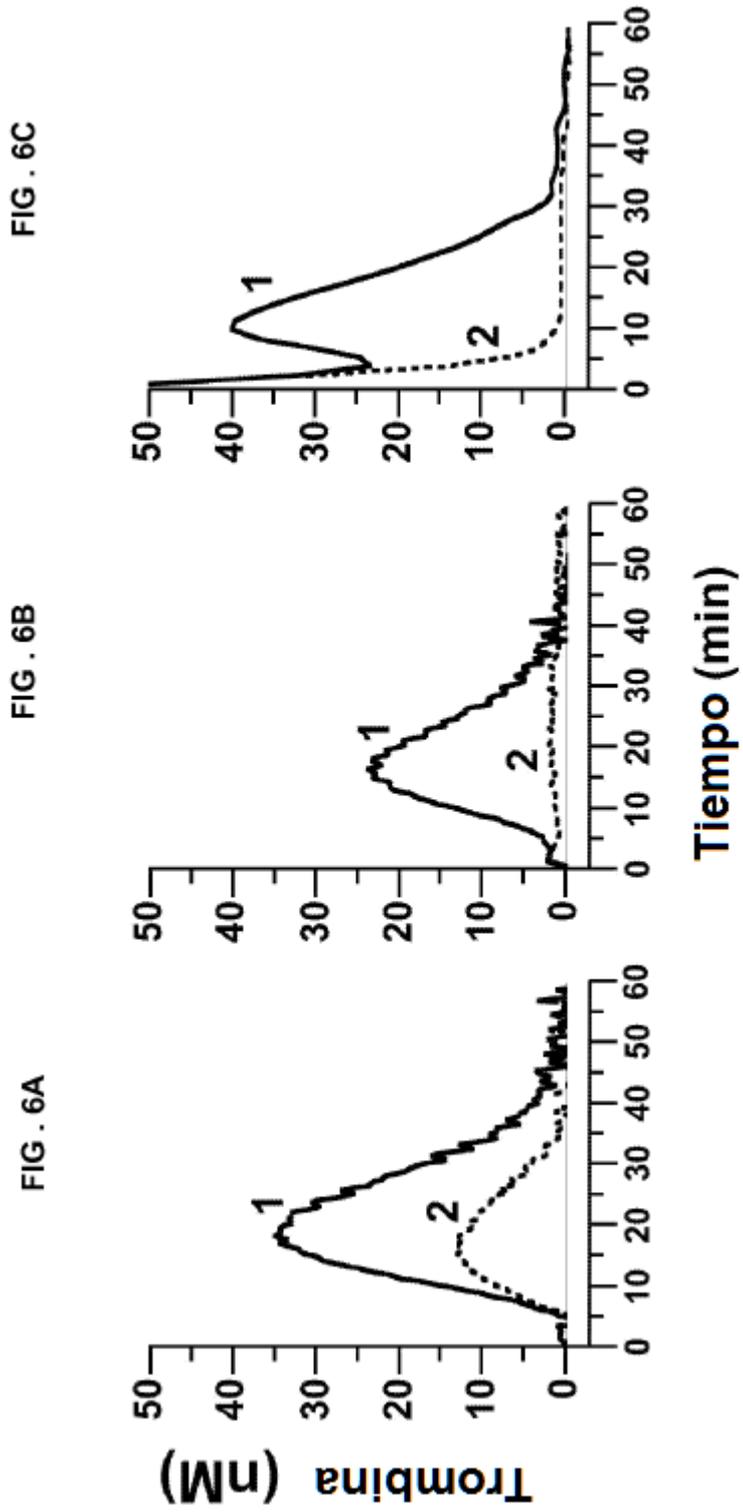


FIG .7B

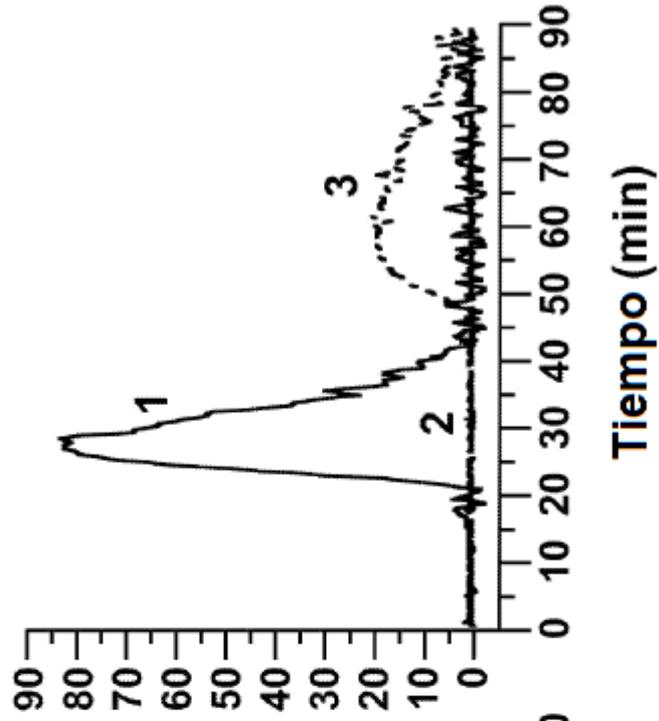


FIG .7A

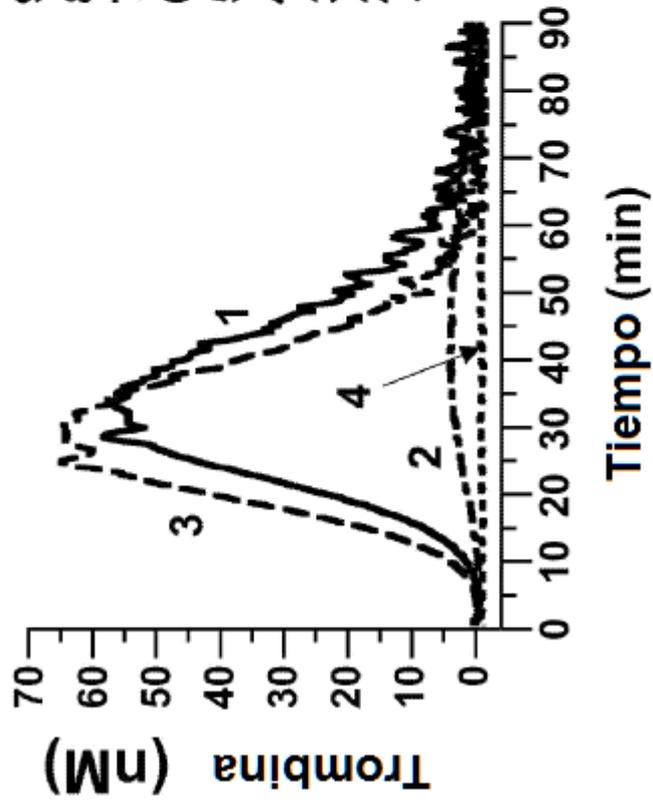
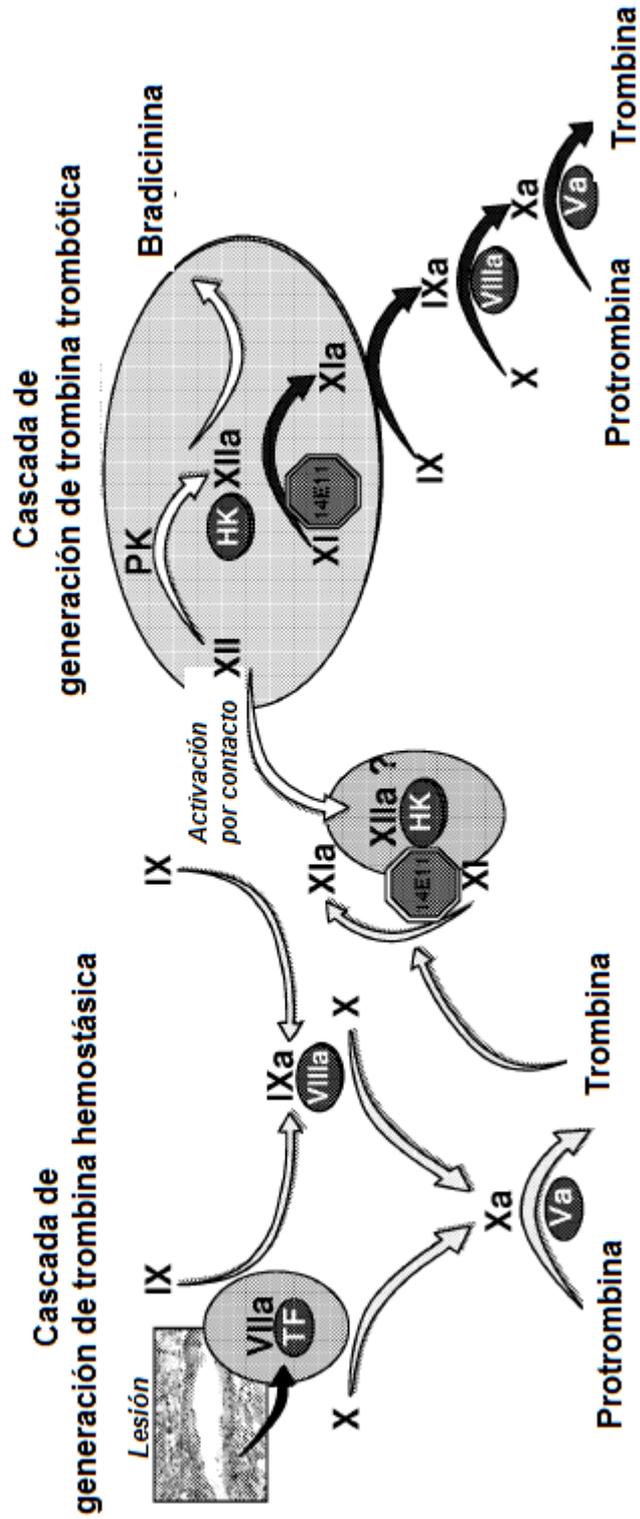


FIG. 8



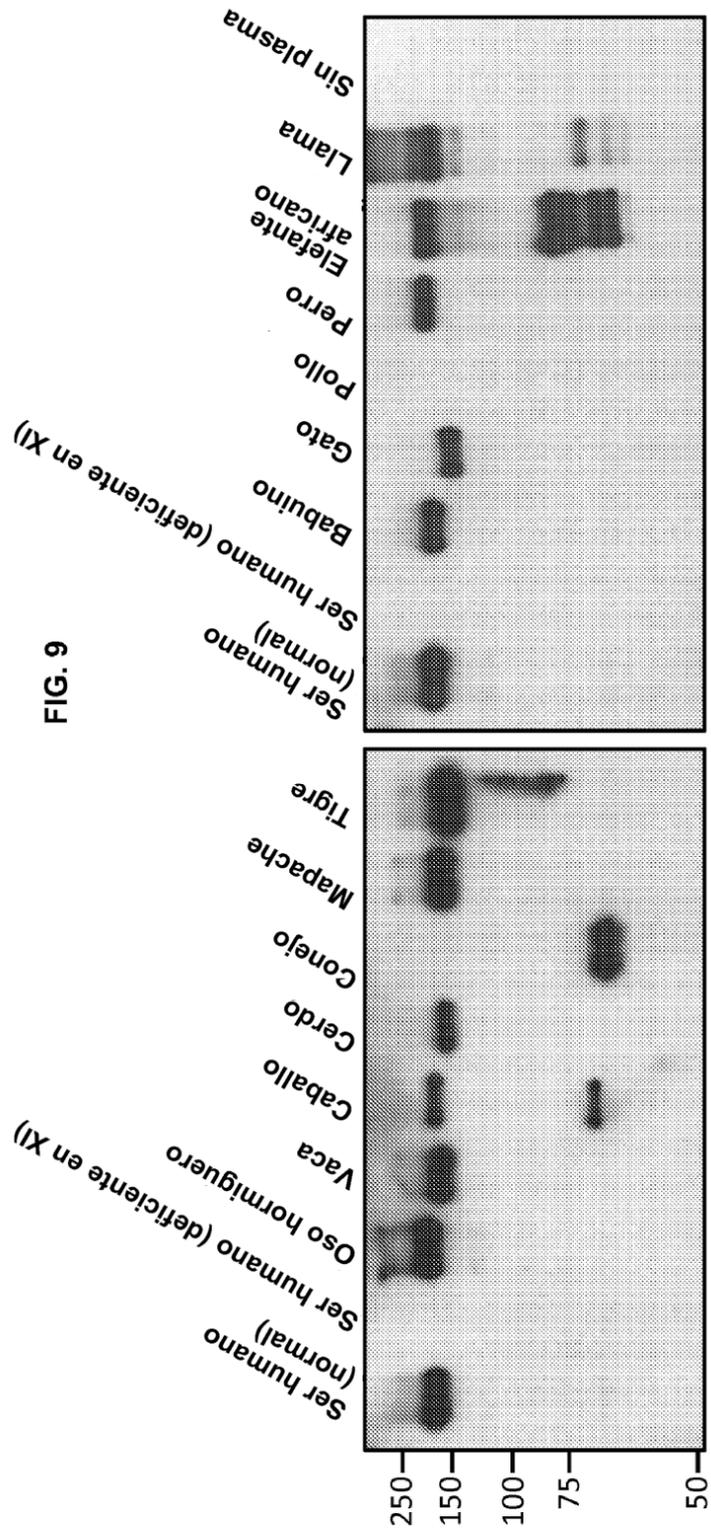


FIG. 10A

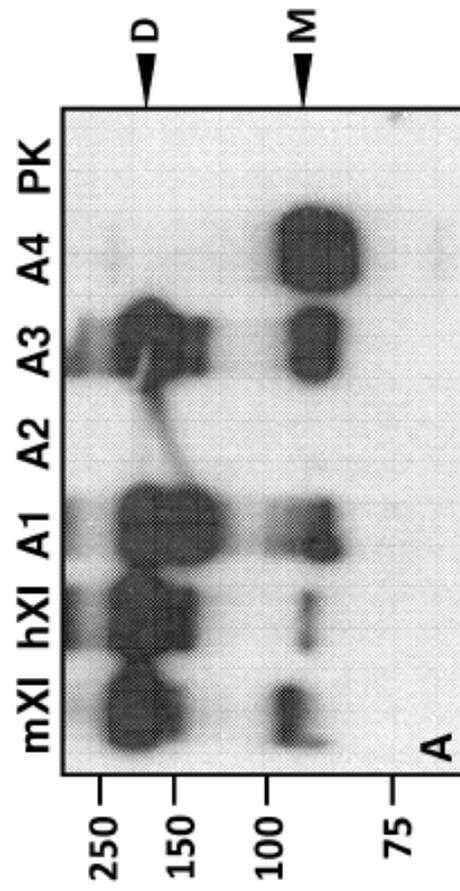


FIG. 10B

