

ANTICUERPOS DE FACTOR XI Y MÉTODOS DE USO

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 62 / 184.955 presentada el 26 de junio de 2015, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 62 / 341.568 presentada el 25 de mayo de 2016, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

La presente solicitud contiene una Lista de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 23 de junio de 2016, se denomina "PAT056955-WO-PCT_SL.txt" y tiene un tamaño de 45,685 bytes.

CONTEXTO

La trombosis se refiere a la formación de trombos dentro de los vasos sanguíneos, posterior a una combinación de factores de riesgo hereditarios y adquiridos, conocidos como trombofilia o estados de hipercoagulabilidad. Daños en la pared vascular, la inmovilización, el aumento de la reactividad de plaquetas y la activación de los factores de coagulación son algunas de las características fundamentales de la trombosis. La trombosis puede ocurrir tanto en la circulación venosa como arterial y puede resultar en el desarrollo de la trombosis venosa profunda (TVP), embolia pulmonar, y accidente cerebrovascular. Si se produce un trombo en el sistema arterial, se puede producir una isquemia aguas abajo, lo que lleva a los síndromes coronarios agudos (SCA), accidente cerebrovascular isquémico e isquemia aguda de las extremidades. La formación de trombos en el sistema venoso por lo general conduce a la trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y a la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica. Los coágulos también pueden formarse en el apéndice auricular izquierdo en pacientes con fibrilación auricular (FA), y los trombos desalojados pueden dar lugar a complicaciones potencialmente devastadoras, es decir, ictus tromboembólico y embolia sistémica. Los medicamentos antitrombóticos disponibles en la actualidad, incluyendo la heparina de bajo peso molecular (HBPM), inhibidores de la trombina, y los inhibidores del Factor Xa (FXa), están asociados con un riesgo significativo de hemorragia (Weitz JI (2010) Thromb. Haemost. 103, 62). El desarrollo de un agente antitrombótico que no afecte la hemostasia, y por lo tanto no dé lugar a complicaciones hemorrágicas, sería muy deseable.

Los anticoagulantes actuales pueden ser ya sea inyectados o tomados por vía oral. El anticoagulante inyectable HBPM se utiliza ampliamente y ofrece un mejor perfil terapéutico con respecto a la heparina no fraccionada normalmente aplicada. En los últimos decenios, el

anticoagulante oral más utilizado ha sido la warfarina. La warfarina tiene un estrecho margen terapéutico que requiere un seguimiento frecuente del estado de coagulación, y muestra una variedad de interacciones fármaco-fármaco. Más recientemente, los inhibidores directos de FXa y trombina, disponibles por vía oral entraron en el mercado anticoagulante y son cada vez más aplicados.

Las HBPM, los inhibidores de FXa y de trombina son todos eficaces en la prevención de la enfermedad tromboembólica venosa postoperatoria, en el tratamiento de la trombosis venosa profunda espontánea, la embolia pulmonar y en la prevención del ictus en la fibrilación auricular. Sin embargo, estos anticoagulantes también se asocian con complicaciones de hemorragia que generalmente fueron comparables a las observadas con los fármacos más antiguos como la warfarina y la heparina no fraccionada. En el ensayo clínico ADVANCE-2, el inhibidor de FXa apixaban (Eliquis) se comparó con la HBPM enoxaparina en pacientes después del reemplazo total de rodilla. Si bien la terapia aguda de apixaban fue más eficaz en la prevención de la enfermedad tromboembólica venosa que la enoxaparina, ambos agentes se asociaron con un riesgo significativo de hemorragias. Una hemorragia clínicamente relevante se produjo en el 4% de los pacientes tratados con apixaban y en el 5% de los pacientes tratados con enoxaparina (Lassen, MR, *et al.* (2009) N. Engl. J. Med. 361, 594).

En el ensayo RE-LY, el inhibidor directo de la trombina dabigatrán (Pradaxa) se comparó con la warfarina en pacientes con fibrilación auricular y un riesgo de derrame cerebrovascular (Connolly, SJ, *et al.* (2009) N. Engl. J. Med. 361, 1139). La terapia crónica con dabigatrán se asoció a un riesgo significativamente menor de ictus o embolia sistémica. Sin embargo, las complicaciones hemorrágicas mayores se produjeron en el 3,1% de los pacientes que recibieron 150 mg por día de dabigatrán y en el 3,4% de los pacientes tratados con warfarina ($p = 0,31$).

La fibrilación auricular (FA) sigue siendo la arritmia cardíaca más común en la práctica clínica, que representa aproximadamente un tercio de las hospitalizaciones por arritmias cardíacas. Actualmente, se estima que afecta a más de 6 millones de pacientes en Europa y aproximadamente 2,3 millones en los Estados Unidos, y este número sigue creciendo rápidamente debido a la creciente proporción de la población que envejece. Se estima que aproximadamente el 5% de la población mayor de 65 años, y el 10% de las personas mayores de 80 años, desarrollará FA, sin embargo, la prevalencia de FA está aumentando más allá de lo que explica la edad por sí sola. Factores de riesgo FA como la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad arterial coronaria, la diabetes mellitus y la apnea obstructiva del sueño están también en aumento. Como tal, se espera que el

número de individuos afectados con FA aumente de dos a tres veces durante las próximas tres décadas en las poblaciones occidentales. (Kannel and Benjamin (2008) *Med Clin North Am.* 2008; 92:17-40; Bunch, et al. (2012) *J Innovations of Card Rhythm Manag* 2012; 3: 855–63).

El principal riesgo de la FA es de cuatro a cinco veces mayor en el accidente cerebrovascular embólico. El riesgo atribuible para el accidente cerebrovascular asociado con FA aumenta considerablemente con la edad hasta un 23,5% en edades de 80 a 89. La FA se asocia con una duplicación de la mortalidad en ambos sexos (Kannel y Benjamín 2008). FA también se asocia de forma independiente con el deterioro cognitivo y todas las formas de demencia (Marzona, *et al* (2012) *CMAJ* 2012; 184: 329-36; Geita et al 2013; Manojó et al 2012).

La mayoría de los pacientes con FA requieren tratamiento anticoagulante de por vida para prevenir el accidente cerebrovascular cardioembólico y embolia sistémica. La puntuación de riesgo CHA₂DS₂-VASc es una herramienta de estratificación validada y ampliamente utilizada para predecir el riesgo tromboembólico en pacientes con fibrilación auricular y para identificar a los pacientes que deben beneficiarse de la terapia anticoagulante (LIP 2011; Camm, *et al* (2012) *Eur Heart J* 2012; 33 : 2719-2747); la evidencia acumulada muestra que CHA₂DS₂-VASc es al menos tan precisa como o posiblemente mejor que, puntuaciones como CHADS₂ en la identificación de los pacientes que desarrollan accidentes cerebrovasculares y el tromboembolismo. Así mismo, fue definitivamente mejor en la identificación de pacientes " con bajo riesgo verdaderamente" de FA. Se estima que entre un 85 a 90% de los pacientes de FA requerirán terapia de anticoagulación.

En un metaanálisis que comprende 6 ensayos que evaluaron el efecto de los antagonistas de la vitamina K (AVK) en la reducción de ictus y embolia sistémica, se observó una muy significativa reducción del riesgo en la incidencia de un accidente cerebrovascular (reducción del riesgo relativo del 67% para un accidente cerebrovascular). Todas las causas de mortalidad se redujeron significativamente (26%) por dosis ajustadas AVK frente al control (Hart, Pearce, y Aguilar (2007) *Ann Intern Med* 2007; 146: 857-867). Una relación normalizada internacional (INR) entre 2 y 3 se asoció con una mejor relación riesgo-beneficio (Hylek et al (2003) *N Engl J Med*; 349: 1019-1026) y fue adoptada universalmente por las normas internacionales y nacionales.

En los últimos años, los nuevos anticoagulantes orales (NOAC), también conocidos como anticoagulantes orales directos (DOAC) han sido aprobados y se introdujeron en la práctica clínica. Estos medicamentos son por lo menos tan eficaces o incluso mejores que la warfarina para reducir la enfermedad tromboembólica (Connolly, et al. (2009) *N Engl J Med*;

361:1139–51; Connolly, et al. (2011) N Engl J Med; 364:806–17; Patel, et al. (2011) N Engl J Med 2011; 365:883–91). Los NOAC también se asociaron con una importante reducción de las complicaciones más devastadoras de la warfarina como los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos y la hemorragia intracraneal. Las hemorragias mayores fueron similares o
5 ligeramente más bajas que con una terapia con warfarina bien realizada. Además, los NOAC están asociados con un menor potencial de interacción fármaco-fármaco que la warfarina y podrían ser utilizados sin el monitoreo de rutina; se espera que esto facilite su uso en la práctica médica diaria.

A pesar de las mejoras recientes, el riesgo de sangrado sigue siendo alto con el uso de
10 anticoagulantes. Por ejemplo, la incidencia anual clínicamente relevante de sangrado importante y no importante fue del 14,9% y la incidencia anual de eventos de sangrado mayores fue del 3,6% en los pacientes tratados con rivaroxaban en el estudio ROCKET (Patel et al 2011). La incidencia anual de hemorragias graves fue > 5% en pacientes con alto riesgo de sangrado definido como puntuación de riesgo de sangrado HAS ≥ 3 (Gallego, et al. (2012) Carc
15 Arrhythm Electrophysiol.; 5:312–318). La hemorragia grave es un resultado clínico particularmente relevante; por ejemplo, en el estudio ROCKET, una vez se ha producido la hemorragia grave, la tasa de mortalidad por todas las causas era del 20,4% en el grupo de rivaroxaban y del 26,1% en el grupo de warfarina. Una vez que ocurrieran las hemorragias importantes, accidentes cerebrovasculares y embolia sistémicas ocurrían en el 4,7% y el 5,4%
20 de los pacientes en los grupos de rivaroxaban y warfarina, respectivamente (Piccini, et al. (2014) Eur Heart J; 35:1873–80). La estancia en el hospital, la transfusión de productos sanguíneos y la utilización de recursos fueron también gravemente impactadas por la aparición de hemorragias graves. El riesgo de hemorragia es también una de las principales razones para no recibir anticoagulantes en pacientes elegibles. En el Euro Heart Survey sobre la fibrilación
25 auricular que comprende datos de 182 hospitales en 35 países y 5333 pacientes con FA ambulatorios y hospitalizados, sólo el 67% de los pacientes elegibles recibieron anticoagulantes orales una vez en alta (Nieuwlaet, et al (2005) Eur Heart J; 26, 2422–2434).

Por tanto, existe una gran necesidad médica no satisfecha de una terapia más segura que pueda reducir las complicaciones tromboembólicas de la FA, como accidente
30 cerebrovascular, embolia sistémica, deterioro cognitivo y la mortalidad con una eficacia comparable a la terapia existente, pero con un sangrado pasivo menor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al Factor de coagulación humano XI y XIa (Factor activado XI) (en lo sucesivo, a veces referido como "FXI", "FXIa," y términos similares), composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos y métodos de tratamiento que comprenden la administración de las mismas. El desarrollo de un agente anti-trombótico que es eficaz en la prevención y tratamiento de la trombosis o la enfermedad/ trastorno tromboembólica (*por ejemplo*, accidente cerebrovascular trombótico, fibrilación auricular, la prevención del ictus en la fibrilación auricular (SPFA), trombosis venosa profunda, tromboembolia venosa, embolia pulmonar, síndromes coronarios agudos (SCA), accidente cerebrovascular isquémico, isquemia de las extremidades aguda, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica, embolia sistémica), pero lleva ninguna o sólo un riesgo mínimo de hemorragia que cumple con una necesidad médica no satisfecha de tamaño considerable.

En aspectos específicos, los anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos monoclonales humanos, quiméricos y humanizados) proporcionados en este documento se unen de forma similar con alta afinidad al dominio catalítico (CD) de FXIa humana y FXI e inducen una conformación inactiva del dominio de proteasa en FXIa.

Los anticuerpos aislados anti-FXI y/o anti-FXIa descritos en este documento, por ejemplo, las IgG completas descritas en la presente memoria con dos sitios de unión, se unen a FXI y/o FXIa con una disociación constante de equilibrio (K_D) de menos de o igual a 100 pM. Por ejemplo, los anticuerpos aislados descritos en este documento pueden unirse a FXI humano y/o FXIa con una K_D de menos de o igual a 100 pM, inferior o igual a 50 pM, inferior o igual a 45 pM, inferior o igual a 40 pM, inferior o igual a 35 pM, inferior o igual a 20 pM, o menor que o igual a 10 pM. Más específicamente, los anticuerpos aislados descritos en este documento también pueden unirse a FXI y/o FXIa humano con una K_D de menos de o igual a 34 pM, como se mide por resonancia de plasmón superficial (SPR), por ejemplo, ensayo de BIACORE™, menos de o igual a 4 pM, según lo medido por el ensayo de titulación con solución de equilibrio (SET); y también puede unirse con FXI de mono cynomolgus y/o FXIa con una K_D de menos de o igual a 53 pM, como se mide por el ensayo de BIACORE™, o menor que o igual a 4 pM, medido por SET. En aspectos específicos, los anticuerpos aislados descritos en este documento (*por ejemplo*, NOV1401) se unen a FXI humano y a FXIa con una K_D aparente de menos de o igual a aproximadamente 5 pM (*por ejemplo*, 4.7 pM) y 2 pM (*por ejemplo*, 1.3 pM), respectivamente, por ejemplo, como se mide por ensayo de valoración solución de equilibrio (SET). En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-FXI/FXIa descritos en este documento se unen a FXI / FXIa de mono cynomolgus con una aparente K_D de aproximadamente 12,5 ($\pm$ 6,6) pM

para FXIa y aproximadamente 5,0 ($\pm$ 0,7) pM, medida por SET (ver, *por ejemplo*, Ejemplo 2). En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-FXI/FXIa descritos en el presente documento se unen a FXI y/o FXIa de conejo con una K_D de 20 ($\pm$ 2) nM aproximadamente. En aspectos específicos, los anticuerpos anti-FXI/FXIa descritos en este documento se unen a FXI y/o FXIa de humano, macaco y conejo, pero no se unen específicamente a FXI de ratón o rata.

Los fragmentos anti-FXI y/o anti-FXIa de unión a antígeno aislados descritos en este documento, *por ejemplo*, los fragmentos Fab y otros fragmentos que contienen un sitio de unión que se unen a FXI y/o FXIa, con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de menos de o igual a 10 nM. Por ejemplo, los fragmentos de unión al antígeno aislados descritos en este documento pueden unirse a FXI y/o FXIa humano con una K_D de menos de o igual a 10 nM, menos de o igual a 5 nM, menos de o igual a 1 nM, menos de o igual a 500 pM, inferior o igual a 305 pM, inferior o igual a 62 pM. Más específicamente, los fragmentos de unión al antígeno aislados descritos en este documento también pueden unirse a FXI y/o FXIa humano con una K_D de menos de o igual a 305 pM.

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, o a fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen a FXIa de humano, de conejo, y de mono cynomolgus. La invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos del mismo de unión al antígeno, que se unen dentro del dominio catalítico de FXI y/o FXIa, específicamente a la superficie de la región del sitio activo.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo aislado o a fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen a FXI y/o FXIa y compiten por la unión con un anticuerpo como se describe en la Tabla 1 (*por ejemplo*, NOV1401). "Competencia" como se describe aquí, entre los anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno de los mismos significa que ambos anticuerpos (o fragmentos de unión de los mismos) se unen al mismo, o que se superponen, epítomos de FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, como se determina por un ensayo de unión competitiva, por cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica). Como se usa en este documento, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo **no** "compite" con un anticuerpo FXI y/o FXIa o fragmento de unión a antígeno de la invención (*por ejemplo*, NOV1401 o NOV1090) a menos que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo competitivo se una al mismo epítopo FXI y/o FXIa, o un epítopo de FXI y/o FXIa superpuesto, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en competencia no incluye uno que (i) bloquee estéricamente a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención de unirse a su diana (*por ejemplo*, si dicho anticuerpo

competidor se une a o cerca de un epítipo FXI y/o FXIa no solapante y físicamente impide que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se una a su objetivo); y/o (ii) se une a un epítipo FXI y/o FXIa diferente que no se solapa e induce un cambio conformacional a la proteína FXI y/o FXIa de manera que dicha proteína ya no puede ser unida por un anticuerpo FXI y/o FXIa o fragmento de unión a antígeno de la invención de la manera en que ocurriría si estuviera ausente dicho cambio conformacional.

En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a FXI y/o FXIa y compiten por la unión con un anticuerpo, como se describe en la Tabla 1 se unen a la mayoría de los aminoácidos del (los) epítipo(s) unido(s) por dicho anticuerpo de la Tabla 1. En otra realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a FXI y/o FXIa y compiten por la unión con un anticuerpo como se describe en la Tabla 1 se unen a todo(s) el(los) epítipo (s) unido(s) por dicho anticuerpo de la Tabla 1.

En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a FXI activo (FXIa), lo que lleva de la unión del dominio catalítico de FXI activo (FXIa), a que FXIa cambie su conformación a una conformación inactiva. En otra realización, dichos anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos inducen además un cambio en el que 4 residuos de N-terminal, los bucles 145, 188 y 220 de dicha conformación inactiva se desplazan y/o se desordenan en comparación con la conformación activa.

En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a FXI (*por ejemplo*, FXI humano) y tras la unión a FXI evitan que el dominio catalítico FXI asuma una conformación activa, en donde los bucles 145, 188 y 220 están clasificados como en la estructura del dominio catalítico FXIa.

En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a FXI y tras la unión a FXI evitan que el dominio catalítico FXI asuma una conformación activa, en donde 4 residuos N-terminal y los bucles de 145, 188 y 220 están clasificados como en la estructura del dominio catalítico FXIa.

En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, se unen a FXI y tras la unión a FXI le evitan al dominio catalítico FXI asumir una conformación activa mediante la inducción de cambios conformacionales en la estructura de zimógeno, lo cual lleva a una conformación inhibidora de FXI estrechamente relacionada con la observada cuando se une a FXIa.

En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a FXI y/o FXIa y tras la unión a FXI y/o FXIa y el formar un complejo

anticuerpo: antígeno con el dominio catalítico de FXI y/o FXIa causa un cambio y/o la desorientación de los bucles 145, 188 y 220 en comparación con la estructura no unida del dominio catalítico del Factor XI activo (FXIa).

5 En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión al antígeno del mismo, se unen a FXI y/o FXIa y tras la unión a FXI y/o FXIa el formar un complejo anticuerpo: antígeno con el dominio catalítico de FXI y/o FXIa provoca un desplazamiento y/o desorientación de los 4 residuos N-terminales, de los bucles 145, 188 y 220 en comparación con la estructura no apareada del dominio catalítico del factor XI activo (FXIa).

10 En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a FXI activo (FXIa) y hacen que el dominio catalítico FXI (FXIa) cambie su conformación a una conformación inactiva, en la que los bucles 145, 188 y 220 son desplazados y/o desorientados en comparación con la conformación activa.

15 En una realización, los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se unen a FXI y evitan que el dominio catalítico asuma una conformación activa mediante la inducción de un cambio conformacional en la estructura de zimógeno, lo que conduce a una conformación de FXI inhibido estrechamente relacionada con la observada cuando se une a FXIa.

20 La presente invención también se refiere además a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al mismo epítipo como un anticuerpo descrito en la Tabla 1 (*por ejemplo*, NOV1401).

25 La afinidad de unión de anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos puede determinarse por titulación con solución de equilibrio (SET). Los métodos para la SET se conocen en la técnica y se describen con más detalle a continuación. Alternativamente, la afinidad de unión de los anticuerpos aislados, o fragmentos, descritos en este documento puede determinarse mediante mediciones de resonancia de plasmones de superficie, *por ejemplo*, en ensayos BIACORE™. Los métodos para ensayos cinéticos BIACORE™ son conocidos en la técnica y se describen en más detalle a continuación.

30 Los anticuerpos anti-FXI y/o FXIa y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos aislados se pueden utilizar para inhibir la activación directa o indirecta del Factor IX (también conocido como FIX), Factor X (FX), y/o la trombina, y/o la unión a los receptores de plaquetas, y por lo tanto puede evitar la activación de las rutas de coagulación intrínseca y/o comunes.

Los anticuerpos aislados anti-FXI y/o FXIa y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos se pueden utilizar para inhibir la activación directa o indirecta del Factor IX (también conocido como FIX), Factor X (FX), y/o trombina con una CI_{50} de menos de o igual a 100 nM,

menos de o igual a 50 nM, menos de o igual a 35 nM, menos de o igual a 25 nM, menos de o igual a 10 nM, o menos de o igual a 5,2 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento puede inhibir la activación directa o indirecta del Factor IX (también conocido como FIX), Factor X (FX), y/o trombina con una CI_{50} de menos de o igual a 100 nM, menos de o igual a 50 nM, menos de o igual a 35 nM, menos de o igual a 25 nM, menos de o igual a 10 nM, o menos de o igual a 5,2 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento puede inhibir la activación directa o indirecta de Factor IX (también conocido como FIX), Factor X (FX), y/o trombina con una CI_{50} de menos de o igual a 100 nM, menos de o igual a 50 nM, menos de o igual a 35 nM, menos de o igual a 25 nM, menos de o igual a 20 nM, o menos de o igual a 18 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento puede inhibir la activación directa o indirecta del Factor IX (también conocido como FIX), Factor X (FX), y/o trombina con una CI_{50} de menos de o igual a 100 nM, menos de o igual a 50 nM, menos de o igual a 35 nM, menos de o igual a 25 nM, menos de o igual a 10 nM, o menos de o igual a 5 nM. En una realización específica, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento, o sus fragmentos de unión a antígeno, inhiben la activación mediada por FXIa de su sustrato nativo FIX con una CI_{50} de menos de o igual a 2 nM, *por ejemplo*, 1,8 nM.

Los anticuerpos aislados anti-FXI y/o anti-FXIa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse para inhibir (*por ejemplo*, bloquear la activación de) las rutas de coagulación intrínseca y/o comunes, *por ejemplo*, a través de la inhibición de FXI y/o FXIa mediada por la activación del FIX. Los anticuerpos aislados anti-FXI y/o anti-FXIa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por lo tanto, puede ser utilizados para prevenir la coagulación o la propagación de la coagulación. Los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden utilizar para prevenir, tratar o mejorar trastornos de la coagulación tales como la trombosis venosa profunda y el accidente cerebrovascular (*por ejemplo*, accidente cerebrovascular isquémico) mediante la inhibición de la activación de FIX mediada por FXI.

En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-FXIa y/o anti-FXI, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son capaces de prolongar el tiempo de coagulación (*por ejemplo*, el tiempo hasta que se comienza a formar un coágulo de sangre) de plasma humano de una manera dependiente de la concentración como lo determina un ensayo de aPTT, *por ejemplo* como se describe en la Sección de Ejemplos. En una realización específica, el tiempo

de coagulación (aPTT) se duplicó en comparación con la línea de base en una concentración total de anticuerpo anti-FXI (*por ejemplo*, NOV1401) en el intervalo de 10 nM a 20 nM, por ejemplo, aproximadamente 14 nM o 15 nM, como se determina por un ensayo de TTPA. En realizaciones particulares, los anticuerpos anti-FXI y/o anti-FXIa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son capaces de prolongar el tiempo de coagulación del plasma humano de una manera dependiente de la concentración con una CI_{50} en el intervalo de 5 nM a 20 nM, por ejemplo, aproximadamente 13 nM, como se determina por el ensayo de aPTT, por ejemplo, como se describe en la Sección de Ejemplos.

En realizaciones específicas, anticuerpos anti-FXI y/o anti-FXIa descritos en este documento, o sus fragmentos de unión a antígeno, son capaces de prolongar el tiempo de coagulación (*por ejemplo*, el tiempo hasta que se comienza a formar un coágulo de sangre) de plasma humano por al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, o 2 veces, por ejemplo, de una manera dependiente de la concentración, como se determina mediante un ensayo de aPTT, por ejemplo como se describe en la sección de Ejemplos. En realizaciones específicas, anticuerpos descritos anti-FXI y/o anti-FXIa en este documento, o sus fragmentos de unión a antígeno, son capaces de prolongar el tiempo de coagulación (*por ejemplo*, el tiempo hasta que se comienza a formar un coágulo de sangre) de plasma humano por al menos 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, o 1,7 veces, como se determina mediante un ensayo de aPTT, por ejemplo como se describe en la Sección de Ejemplos.

En aspectos específicos, anticuerpos anti-FXI y/o anti-FXIa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se describe en el presente documento son capaces de reducir la cantidad de trombina, de una manera dependiente de la concentración, en un ensayo de generación de trombina (TGA) en el plasma humano, que mide el efecto de la inhibición de FXIa en el bucle de retroalimentación de trombina → FXIa en presencia de concentraciones muy bajas de factores tisulares (TF). En realizaciones particulares, anticuerpos anti-FXI y/o anti-FXIa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se describen en el presente documento son capaces de reducir la cantidad de trombina en un ensayo de generación de trombina (TGA) en el plasma humano con un valor de IC_{50} en el rango de 10 nM a 30 nM, por ejemplo, aproximadamente 20 nM o 24 nM, y una concentración de trombina residual de aproximadamente 159 nM.

Aspectos específicos, proporcionados en este documento son los anticuerpos (*por ejemplo*, los anticuerpos de la Tabla 1 como NOV1401 o anticuerpos que comprenden las HCDRs 1-3 y 1-3 LCDRs de NOV1401), o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que

se une específicamente al dominio catalítico humano FXI y/o FXIa, y que tiene una media de eliminación terminal ($t_{1/2}$) de anticuerpos totales en macacos cynomolgus, de aproximadamente 14-15 días. En realizaciones específicas, tales anticuerpos anti-FXI/FXIa exhiben una biodisponibilidad absoluta subcutánea (s.c) de aproximadamente 61 a 66%.

5 En una realización específica, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en este documento (*por ejemplo*, el anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401), que se une específicamente a FXI humano y/o FXIa, exhibe uno o más (*por ejemplo*, dos, o tres, o cuatro, o cinco, o seis, o siete), o la totalidad, de las siguientes características:

- 10 i.se une específicamente a un dominio catalítico (CD) de FXI humano y FXIa, por ejemplo, con una K_D aparente de aproximadamente 1 a 2 pM y 4-5 pM respectivamente;
- ii.prolonga el tiempo de coagulación como se evaluó mediante el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT);
- 15 iii.inhibe la generación de trombina en el plasma humano a través de la inhibición de la activación FXI por el Factor XII activado (FXIIa) y por la trombina, respectivamente;
- iv.muestra actividad antitrombótica y anticoagulante en ratones FXI -/- reconstituidos con FXI humano;
- 20 v.reduce o prolonga la reducción de los niveles de FXI (FXI_f) libre, por ejemplo, en monos cynomolgus;
- vi.tiene una vida media de eliminación terminal de anticuerpo total de aproximadamente 14 a 15 días, por ejemplo, en monos cynomolgus;
- 25 vii.se une específicamente a FXI humano y de mono y/o FXIa pero no se une específicamente a FXI y/o FXIa de ratón o rata; y
- 30 viii.contacta uno o más (*por ejemplo*, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete, o más), algunos, o todos, de los siguientes residuos de FXI humano (numeración Swissprot): Pro410, Arg413, Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472-Glu476, Tyr521-Lys527, Arg548, His552, Ser575, Ser594-Glu597, y Arg602-Arg604.

Los anticuerpos aislados anti-FXI y/o FXIa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla,

fragmentos Fab, fragmentos Fv, F(ab')₂, o fragmentos scFv, y/o los isotipos de IgG (*por ejemplo*, IgG1, tal como IgG1 humana). En realizaciones específicas, anti-FXI y/o anticuerpos anti-FXIa descritos en este documento son anticuerpos humanos recombinantes. En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-FXIa y/o anti-FXI descritos en este documento son anticuerpos humanos IgG1/ lambda (λ). En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-FXIa y/o anti-FXI descritos en este documento son anticuerpos humanos IgG1 / lambda (λ) que comprenden un dominio Fc diseñado para reducir el potencial de la función efectora (*por ejemplo*, ADCC y/o CDC), por ejemplo, un dominio Fc humano que comprende sustituciones D265A y/o P329A.

Los anticuerpos aislados anti-FXI y/o FXIa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento también pueden incluir un marco en el que un aminoácido ha sido sustituido en el marco de anticuerpos de las respectivas secuencias VH o VL de la línea germinal humanas.

Otro aspecto de la invención incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tiene las secuencias de cadena pesada y ligera completas de los Fab descritos en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden tener las secuencias de cadena pesada y ligera de NOV1090 y NOV1401.

Un aspecto adicional de la invención incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tiene las secuencias de cadenas pesada y ligera de dominio variable de Fab descritas en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener la secuencia de dominio de la cadena pesada y ligera variable de NOV1090 y NOV1401.

Un aspecto adicional de la invención incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tiene el dominio variable de cadena pesada de CDR (*es decir*, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y el dominio variable de cadena ligera del CDR (*es decir*, LCDR1, LCDR2 y LCDR3), las secuencias de anticuerpos descritas en la Tabla 1, tales como CDRs de Kabat, CDRs IMGT, CDR de Chothia, o CDR combinados. Más específicamente, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede tener las secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de NOV1090 y NOV1401, por ejemplo tal como se presenta en la Tabla 1, tales como CDRs de Kabat, CDRs IMGT, Chothia CDRs o CDRs combinados.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que incluye una CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que

consiste en SEQ ID NOs: 3 y 23; una CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 y 24; y una CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 5 y 25, en el que el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, se une a FXI humano y/o FXIa. En otro aspecto, tal anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo incluyen, además una CDR1 de cadena ligera de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13 y 33; una CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14 y 34; y una CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15 y 35.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que incluye una CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13 y 33; una CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14 y 34; y una CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15 y 35, en la que el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen a FXI humano y/o FXIa.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen a FXI y/o FXIa y tienen HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden la SEQ ID NOs: 3, 4, y 5, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprenden SEQ ID NOs: 13, 14, y 15; o HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden la SEQ ID NOs: 23, 24, y 25, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprenden la SEQ ID NOs: 33, 34, y 35.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen a FXI y/o FXIa y tienen HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 43, 44 y 45, respectivamente, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 47, 37, y 15, respectivamente.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen a FXI y/o FXIa y tienen HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden la SEQ ID NOs: 46, 4 y 5, respectivamente, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 33, 14, y 15, respectivamente.

La invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la cadena pesada variable de la SEQ ID NOs: 9 y 29, y de la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la cadena ligera variable de la SEQ ID NOs: 19 y 39, tal como se define por Chothia. En otro aspecto de la invención, el fragmento de unión al anticuerpo o

antígeno puede tener la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la secuencia del dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NOs: 9 y 29, y la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio variable de cadena ligera secuencia de SEQ ID NOs: 19 y 39, tal como se define por Kabat.

5 La invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la cadena pesada variable de la SEQ ID NOs: 9 y 29, y de la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la cadena ligera variable de la SEQ ID NOs: 19 y 39, tal como se define por IMGT. En otro aspecto de la invención, el fragmento de unión al anticuerpo o antígeno puede tener la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la secuencia del dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NOs: 9 y 29, y la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio variable de
10 cadena ligera secuencia de SEQ ID NOs: 19 y 39, tal como se define por Combinado.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo incluye una secuencia del dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9 y 29. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno puede comprender además, una secuencia de dominio variable de cadena ligera en la que el
15 dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se combinan para formar un sitio de unión a antígeno para FXIa. En particular, la secuencia del dominio variable de cadena ligera puede seleccionarse de las SEQ ID NOs: 19 y 39 en el que dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a FXI y/o FXIa.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a
20 antígeno del mismo que incluyen una secuencia del dominio variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19 y 39, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen a FXI humano y/o FXIa. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno puede comprender además una secuencia de dominio variable en donde el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de
25 cadena pesada, se combinan para formar un sitio de unión de antígeno para FXI y/o FXIa.

En particular, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a FXI y/o FXIa, pueden tener dominios variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de SEQ ID NOs: 9 y 19; o 19 y 39, respectivamente.

La invención se refiere además a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a
30 antígeno del mismo, que incluyen un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9 y 29, en el que dicho anticuerpo se une a FXI y/o FXIa. En un aspecto, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, también incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 80%, 85%,

90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19 y 39. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno tiene una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se define por Kabat y como se describe en la Tabla 1. En una
5 realización específica, anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno tienen una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se define por Chothia, IMGT, o Combinados y como se describe en la Tabla 1.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 80%,
10 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19 y 39, en el que dicho anticuerpo se une a FXI y/o FXIa.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen a FXI y/o FXIa puede tener una cadena pesada que comprende la
15 secuencia de SEQ ID NOs: 11 o 31. El anticuerpo aislado puede incluir también una cadena ligera que puede combinarse con la cadena pesada para formar un sitio de unión al antígeno a FXI humano y/o FXIa. En particular, la cadena ligera puede tener una secuencia que comprende SEQ ID NO: 21 o 41. En particular, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen a FXI y/o FXIa, pueden tener una cadena pesada y una
20 cadena ligera que comprenden las secuencias de SEQ ID NOs: 11 y 21; o 31 y 41, respectivamente.

La invención se refiere además a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye una cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 11 o 31, en
25 el que dicho anticuerpo se une a FXI y/o FXIa. En un aspecto, el anticuerpo o fragmentos del mismo de unión a antígeno también incluye una cadena ligera que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 21 o 41.

La invención se refiere además a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a
30 antígeno del mismo que incluye una cadena ligera que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 21 o 41, en donde dicho anticuerpo se une a FXI y/o FXIa.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en este documento, así como,

composiciones de anticuerpo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, la invención incluye además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo de la Tabla 1, tales como, por ejemplo NOV1090 anticuerpo y NOV1401. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de dos o más de los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos antígenos de la Tabla 1.

La invención también se refiere a una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable que tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 9 y 29. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 10 y 30. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es SEQ ID NO: 10 o 30.

La invención también se refiere a una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica la cadena ligera variable que tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 20 y 40. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20 y 40. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es SEQ ID NOs: 20 y 40.

La invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20 y 40.

La invención también se refiere a un vector que incluye una o más de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento.

La invención también se refiere a una célula hospedera aislada que incluye una secuencia de ADN recombinante que codifica una cadena pesada del anticuerpo descrito anteriormente, y una segunda secuencia de ADN recombinante que codifica una cadena ligera del anticuerpo descrito anteriormente, en el que dichas secuencias de ADN están unidas operativamente a un promotor y son capaces de ser expresados en la célula hospedera. Se contempla que el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. También se contempla que la célula hospedera es una célula de mamífero no humano.

La invención también se refiere a un método de reducción de la expresión de FXI y/o FXIa, y/o la activación de la vía de la coagulación intrínseca y/o común, en el que el método incluye la etapa de poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de una composición

que comprende el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo descritos en este documento.

5 La invención también se refiere a un método de inhibición de la unión de FXI y/o FXIa a FIX, en el que el método incluye la etapa de poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo descrito en este documento.

Se contempla que la célula es una célula humana. Es además contemplado que la célula está en un sujeto. En una realización, se contempla que la célula es una de las plaquetas. Todavía se contempla además que el sujeto es humano.

10 La invención también se refiere a un procedimiento para tratar, mejorar, o prevenir una enfermedad tromboembólica en un sujeto, en el que el método incluye la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo descritos en este documento. En un aspecto, la enfermedad tromboembólica es un trastorno trombótico (*por ejemplo*, trombosis, ictus trombótico, la
15 fibrilación auricular, la prevención del ictus en la fibrilación auricular (SPFA), trombosis venosa profunda, tromboembolismo venoso, y la embolia pulmonar). Se contempla que el sujeto es humano.

Cualquiera de los anticuerpos aislados anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden ser un anticuerpo monoclonal o fragmentos de unión a antígeno de los
20 mismos.

Formas de realización no limitativas de la divulgación se describen en los siguientes aspectos:

1. Un anticuerpo aislado anti-FXI y/o anti-FXIa o fragmento del mismo que se une dentro del dominio catalítico de FXI y/o FXIa.

25 2. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a uno o más epítomos de anti-FXI y/o FXIa, en el que el epítopo comprende dos o más residuos de aminoácidos de Pro410, Arg413, Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523, Leu524, Arg525, Asp526, Lys527, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603 y Arg604..

30 3. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 2, en el que el epítopo comprende cuatro o más residuos de aminoácidos de Pro410, Arg413, Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523,

Leu524, Arg525, Asp526, Lys527, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603 y Arg604.

4. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 2, en el que el epítipo comprende seis o más residuos de aminoácidos de Pro410, Arg413, Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523, Leu524, Arg525, Asp526, Lys527, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603 y Arg604.

5. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 2, en el que el epítipo comprende ocho o más residuos de aminoácidos de Pro410, Arg413, Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523, Leu524, Arg525, Asp526, Lys527, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603 y Arg604.

6. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 2, en el que el epítipo comprende los residuos de Pro410, Arg413, Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523, Leu524, Arg525, Asp526, Lys527, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603 y Arg604.

7. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 2, en el que el epítipo comprende residuos de aminoácidos de Pro410, Arg413, Lys527 y uno o más residuos de aminoácidos de Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523, Leu524, Arg525, Asp526, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603 y Arg604..

8. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 2, en el que el epítipo comprende residuos de aminoácidos de Pro410, Arg413, Lys527 y cuatro o más residuos de aminoácidos de Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523, Leu524, Arg525, Asp526, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603 y Arg604..

9. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 2, en el que el epítipo comprende residuos de aminoácidos de Pro410, Arg413, Lys527 y seis o más residuos de aminoácidos de Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472, Lys473, Met474, Ala475, Glu476, Tyr521, Arg522, Lys523, Leu524, Arg525, Asp526, Arg548, His552, Ser575, Ser594, Trp595, Gly596, Glu597, Arg602, Glu603, y Arg604.

10. Un anticuerpo aislado anti-FXI y/o anti-FXIa o fragmento del mismo que se une dentro del dominio catalítico de FXI y/o FXIa, en el que bloques de anticuerpo o fragmentos de FXI y/o FXIa se unen a uno o más Factores IX, XIIa y trombina.

5 11. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 10, en donde dicho anticuerpo o fragmento bloquea a FXI y/o FXIa se unen a uno o más Factores IX, XIIa, o trombina, y otros componentes de la vía de coagulación.

12. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento bloquea de uno o más FIX, FXI y FXIa cuando se une a los receptores de plaquetas.

10 13. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento impide la activación de las rutas de coagulación intrínseca o comunes.

14. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a un FXI humano y/o proteína FXIa con una K_D de menos de o igual a 34 nM, como se mide por el ensayo BIACORE™, o menor que o igual a 4 pM, tal como se mide mediante el ensayo de titulación con solución de equilibrio (SET).

15 15. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende al menos una región determinante de complementariedad que tiene al menos 90% de identidad con al menos una de las CDR enumeradas en la Tabla 1.

16. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de la Tabla 1.

20 17. Una variante aislada del anticuerpo o fragmento del aspecto 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de la Tabla 1, y en el que la variante tiene al menos de uno a cuatro cambios de aminoácidos en una de CDR1, CDR2 o CDR3.

25 18. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una cadena pesada CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 y 25.

30 20. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y 29 o una secuencia de aminoácidos con 90% de identidad de la misma; y una VL selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 19 y 39 o una secuencia de aminoácidos con el 90% de identidad de la misma.

21. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y 29 o una secuencia de aminoácidos con 95% de identidad de la misma; y una VL seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 19 y 39 o una secuencia de aminoácidos con 95% de identidad de la misma.

22. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una VH seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y 29 o una secuencia de aminoácidos con 97% de identidad de la misma; y una VL seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 19 y 39 o una secuencia de aminoácidos con 97% de identidad de la misma.

23. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 9 y 29.

24. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una secuencia de cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 19 y 39.

25. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y 29; y la secuencia de cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 19 y 39.

26. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento seleccionado del grupo consiste en un anticuerpo o fragmento que comprende una cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 9 y una secuencia de cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 19 y un anticuerpo o fragmento que comprende una cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 29 y una secuencia de cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 39.

27. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 46; CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4; CDR3 seleccionada del grupo que consiste en 5; una región variable de cadena ligera CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 33; CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14; y CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15.

28. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y 23; CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 24; CDR3 seleccionada del grupo que consiste en 5 y 25; una región variable de cadena ligera CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13 y 33; CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14 y 34; y CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15 y 35.

29. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 y 26; CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 27; CDR3 seleccionada del grupo que consiste en 8 y 28; una región variable de cadena ligera CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y 36; CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 y 37; y CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 y 38.

30. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 3; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 4; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 5; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 13; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID NO: 14; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 15.

31. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 23; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 24; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 25; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 33; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 35.

32. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 6; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 7; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 8; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 16; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID NO: 17; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 18.

33. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 26; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 27; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 36; una
5 región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID NO: 37; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 38.

34. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de uno de los aspectos precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento
10 se une al mismo epítipo que un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier aspecto anterior.

36. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento compite por la unión a un FXI humano y/o proteína FXIa con un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier aspecto anterior.

15 37. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento se selecciona del grupo que consiste en NOV1090 y NOV1401.

38. Un método de tratamiento de un trastorno tromboembólico que comprende administrar a un sujeto aquejado de un trastorno tromboembólico una cantidad eficaz de una
20 composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier aspecto anterior.

39. El procedimiento del aspecto 38, en el que el sujeto está asociado a uno o más accidentes cerebrovasculares isquémicos asociados con la fibrilación auricular y la trombosis venosa profunda.

40. El procedimiento del aspecto 38, en el que el sujeto se asocia a un accidente
25 cerebrovascular isquémico asociado con la fibrilación auricular.

41. Un método para tratar un trastorno tromboembólico que comprende administrar a un sujeto aquejado de un trastorno tromboembólico de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier aspecto anterior en combinación con terapias de estatinas.

30 42. Un medicamento que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto anterior.

43. Un ácido nucleico que codifica para uno o más de los anticuerpos de acuerdo con cualquier aspecto anterior.

44. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 43.

45. Una célula hospedera que comprende el vector de aspecto 44.

5 46. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento, tras la unión al dominio catalítico de FXI activo (FXIa) a FXIa cambiando su conformación a una conformación inactiva, en la que los 4 residuos de N-terminal, bucles 145, 188 y 220 están desplazados y/o desordenados en comparación con la conformación activa.

10 47. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en la que el anticuerpo o fragmento tras la unión a FXI impide al dominio catalítico FXI asumir una conformación activa, en la que los bucles 145, 188 y 220 están clasificados como en la estructura del dominio catalítico FXIa.

15 48. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento tras la unión a FXI impide al dominio catalítico FXI asumir una conformación activa, en la que los 4 residuos N-terminal, bucles 145, 188 y 220 están ordenados como en la estructura del dominio catalítico FXIa.

20 49. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento tras la unión a FXI impide al dominio catalítico FXI de asumir una conformación activa mediante la inducción de cambios conformacionales en la estructura de zimógeno, lo que conduce a una conformación inhibida de FXI estrechamente relacionada con la observada al momento de enlazarse con FXIa.

25 50. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en donde el anticuerpo o fragmento, tras la unión a FXI y/o FXIa y la formación de un complejo anticuerpo: antígeno con el dominio catalítico de FXI y/o FXIa, provoca un desplazamiento y/o desorientación de los bucles 145, 188 y 220 en comparación con la estructura no complejada del dominio catalítico del Factor activo XI (FXIa).

30 51. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento, tras la unión a FXI y/o FXIa y la formación de un complejo anticuerpo: antígeno con el dominio catalítico de FXI y/o FXIa, provoca un desplazamiento y/o desorientación de los 4 residuos N-terminales, los bucles 145, 188 y 220 en comparación con la estructura no complejada del dominio catalítico de Factor XI activo (FXIa).

52. El anticuerpo aislado o fragmento del aspecto 1, en el que el anticuerpo o fragmento se une a FXI activa (FXIa) y hace que el dominio catalítico de FXI (FXIa) cambie su conformación a una conformación inactiva, en la que los bucles 145, 188 y 220 son desplazados y/o desorientados en comparación con la conformación activa.

5 DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

10 Los términos "proteína FXI", "antígeno FXI," y "FXI" se utilizan indistintamente, y se refieren a la proteína del Factor XI en diferentes especies. El Factor XI es el Factor XI de coagulación de plasma mamífero, una glicoproteína presente en el plasma humano a una concentración de 25-30 nM como un zimógeno que cuando se convierte por proteólisis limitada a una proteasa de serina activa, participa en la vía intrínseca de la coagulación de la sangre.

15 Los términos "proteína FXIa", "antígeno FXIa," y "FXIa", se utilizan indistintamente, y se refieren a la proteína FXI activada en diferentes especies. El Factor XI zimógeno se convierte en su forma activa, el Factor de coagulación XIa (FXIa), ya sea a través de la fase de contacto de la coagulación de la sangre o a través de la activación mediada por trombina en la superficie de las plaquetas. Durante esta activación del Factor XI, un enlace peptídico interno se escinde en cada una de las dos cadenas, dando como resultado el Factor activado XIa, una proteasa
20 serina compuesta de dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas por enlaces disulfuro. Esta proteasa serina FXIa convierte el Factor IX de coagulación en IXa, que posteriormente activa el Factor de coagulación X (Xa). Xa, entonces, puede mediar la activación trombina/Factor de coagulación II. Por ejemplo, el FXI humano tiene la secuencia como se establece en la Tabla 1 (Mandle RJ Jr, et al. (1979) Blood;54(4):850; NCBI secuencia de referencia: AAA51985).

25 En el contexto de esta invención, los términos "FXI" y "FXIa" (y similares) incluyen mutantes y variantes del FXI natural y la proteína FXIa, respectivamente, que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la de la estructura primaria nativa (secuencia de aminoácidos) que se describe en los informes mencionados anteriormente.

30 El término "dominio catalítico", " dominio catalítico de la serina proteasa", y términos similares como se usa aquí, significan aminoácidos Ile370 a Val607, como contados desde la Glu1 en el extremo N-terminal de la proteína madura que está en circulación. También se puede describir como residuos 388-625 en el extremo C-terminal de FXI. Tal como se utiliza aquí, el término "sitio activo" significa la tríada catalítica que comprende los aminoácidos His413, Asp462 y Ser557. (Bane and Gailani (2014) Drug Disc. 19(9)).

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

El término "anticuerpo" como se usa en este documento significa un anticuerpo entero y cualquier fragmento de unión a antígeno (*es decir*, "porción de unión a antígeno") o de cadena única de los mismos. Un anticuerpo completo es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos del hospedero o Factores, incluyendo varias células del sistema inmune (*por ejemplo*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (*por ejemplo*, Factor XIa (FXIa)). Las funciones de unión a un antígeno de un anticuerpo pueden ser realizadas por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término porción de unión al antígeno o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo incluido un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un F (ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward *et al.*, 1989 Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH o un dominio VL; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un péptido enlazador artificial que les permite ser una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, *por ejemplo*, e.g., Bird et al., 1988 Science 242:423-426; and Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla incluyen una o más porciones de unión a antígeno o fragmentos de un anticuerpo. . Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos son analizados para evaluar su utilidad de la misma manera que se realiza con los anticuerpos intactos.

Fragmentos de unión al antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, *por ejemplo*, Hollinger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126 -1136). Porciones de unión a antígeno de anticuerpos puede ser injertados en andamios a base de polipéptidos tales como fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de los Estados Unidos. Nº 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina).

Los fragmentos de unión a antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena sencilla que comprenden un par de segmentos tándem de Fv (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., 1995 Protein. Eng 8 (10): 1057-1062; y patente de Estados Unidos No. 5.641.870).

Tal como se utiliza aquí, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en los sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "brazo" interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; entre más interacciones, más fuerte es la afinidad. Tal como se utiliza aquí, el término "alta afinidad" para un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno (*por ejemplo*, un fragmento Fab) generalmente se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que tienen una K_D de 10^{-9} M o menos (*por ejemplo*, una K_D de 10^{-10} M o menos, una K_D de 10^{-11} M o menos, una K_D de 10^{-12} M o menos, una K_D de 10^{-13} M o menos, una K_D de 10^{-14} M o menos, etc.).

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintético, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, *por ejemplo*,

hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un ácido de origen natural amino, es *decir*, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *por ejemplo*, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (*por ejemplo*, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

El término "especificidad de unión", como se usa aquí se refiere a la capacidad de un sitio de combinación de anticuerpos individuales para reaccionar con solamente un determinante antigénico.

La frase "específicamente (o selectivamente) se une" a un anticuerpo (*por ejemplo*, un FXI y/o FXIa anticuerpo de unión) se refiere a una reacción de unión que es determinante en la presencia de un antígeno afín (*por ejemplo*, un FXI humano y/o FXIa o FXI y/o FXIa cynomolgus) en una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en este documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

El término "mediado por FXI y/o FXIa" se refiere al hecho de que FXI y/o FXIa media las rutas de coagulación intrínsecas y/o comunes mediante la activación directa o indirecta del Factor IX (también conocido como FIX), Factor X (FX), y/o la trombina, y/o mediante la unión a los receptores plaquetarios.

El término "hemostasis" representa los principales mecanismos para detener el flujo de sangre en sitios de lesión y la restauración de la permeabilidad vascular durante la cicatrización de heridas, respectivamente. Durante la hemostasis normal y trombosis patológica, tres mecanismos se activan simultáneamente: la hemostasia primaria que hace referencia a las interacciones de las plaquetas activadas con la pared del vaso, la formación de fibrina, y un proceso denominado como la fibrinólisis.

Los términos "coagulación y la coagulación en cascada", "modelo de cascada de la coagulación", y similares, se refieren al sistema basado en proteínas que sirve para estabilizar un coágulo que se ha formado para sellar una herida. La vía de coagulación es una cascada proteolítica. Cada enzima de la vía está presente en el plasma como un zimógeno (en una forma inactiva), que en la activación se somete a escisión proteolítica para liberar el Factor

activo de la molécula precursora. La cascada de coagulación funciona como una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa que controlan el proceso de activación. El objetivo final de la vía es producir trombina, que luego puede convertir el fibrinógeno soluble en fibrina lo que forma un coágulo.

5 El proceso de generación de la trombina se puede dividir en tres fases: las vías intrínseca y extrínseca, que proporcionan rutas alternativas para la generación de un Factor de coagulación activo: FXa (Factor -X Activado), y la vía común final, lo que resulta en la formación de trombina (Hoffman MM DM y Monroe (2005) Curr Hematol Rep 4: 391 -396; John J., et al.(2006) Biol Chem 387: 173-178).

10 "La agregación de plaquetas" se refiere al proceso por el que se produce una rotura en un vaso sanguíneo, y se exponen sustancias que normalmente no están en contacto directo con el flujo sanguíneo. Estas sustancias (principalmente de colágeno y el Factor de von Willebrand) permiten que las plaquetas se adhieran a la superficie rota. Una vez que una de las plaquetas se adhiere a la superficie, libera sustancias químicas que atraen plaquetas
15 adicionales a la zona dañada, referida como la agregación de plaquetas. Estos dos procesos son las primeras respuestas para detener la hemorragia.

Un "trastorno tromboembólico," o términos similares, como se usa en el presente documento, se refieren a cualquier número de condiciones o enfermedades en las que las rutas de coagulación intrínseca y/o comunes se activan aberrantemente o no se desactivan de forma
20 natural (*por ejemplo*, sin medios terapéuticos). Estas condiciones incluyen pero no se limitan a un accidente cerebrovascular trombótico, la fibrilación auricular, la prevención del ictus en la fibrilación auricular (SPFA), trombosis venosa profunda, tromboembolismo venoso, y la embolia pulmonar. Estos también pueden incluir condiciones relacionadas con el catéter (*por ejemplo*, catéter de Hickman en pacientes de oncología) en la que los catéteres presentan trombosis, y la
25 oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO), en la cual el tubo desarrolla coágulos.

Una condición "tromboembólica," o términos similares, como se usa en este documento, también puede referirse a cualquier número de las siguientes condiciones, en donde los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención o anti-FXI y/o FXIa Abs, se pueden utilizar para prevenir o tratar:

- 30
- Tromboembolismo en pacientes con arritmia cardíaca presunta o confirmada como paroxística, fibrilación auricular persistente o permanente, aleteo auricular;
 - La prevención del ictus en la fibrilación auricular (SPFA), en una subpoblación de pacientes con FA sometidos a intervenciones coronarias percutáneas (ICP);

- El tratamiento de eventos tromboembólicos venosos agudos (TEV) y la prevención del TEV secundaria prolongada en pacientes con alto riesgo de sangrado;
- Eventos cerebrales y cardiovasculares en la prevención secundaria después de un ataque isquémico transitorio (AIT) o ictus no incapacitante y la prevención de eventos tromboembólicos en la insuficiencia cardíaca con ritmo sinusal;
- La formación de coágulos en la aurícula izquierda y el tromboembolismo en pacientes sometidos a cardioversión para la arritmia cardíaca;
- Trombosis antes, durante y después del procedimiento de ablación de arritmias cardíacas;
- Trombosis venosa, esto incluye, pero no exclusivamente, el tratamiento y la prevención profunda o superficial de trombosis venosa en los miembros inferiores o miembros superiores, la trombosis en las venas abdominales y torácicas, trombosis del seno y trombosis de venas yugulares;
- Trombosis en cualquier superficie artificial en las venas como catéteres o cables de marcapasos;
- Embolismo pulmonar en pacientes con o sin trombosis venosa;
- Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC);
- Trombosis arterial en la placa aterosclerótica rota, trombosis en prótesis intra-arterial o catéter y trombosis en las arterias de apariencia normal, esto incluye pero no se limita a los síndromes coronarios agudos, infarto de miocardio con elevación del segmento ST, no infarto de miocardio con elevación del segmento ST, angina inestable, trombosis de stent, trombosis de cualquier superficie artificial en el sistema arterial y trombosis de arterias pulmonares en sujetos con o sin hipertensión pulmonar;
- Trombosis y tromboembolismo en pacientes sometidos a intervenciones coronarias percutáneas (ICP);
- Derrames cardioembólicos y criptogénicos;
- Trombosis en pacientes con neoplasias cancerosas invasivas y no invasivas;
- Trombosis sobre un catéter permanente;
- Trombosis y tromboembolismo en pacientes gravemente enfermos;
- Trombosis cardíaca y tromboembolia, esto incluye, pero no exclusivamente trombosis cardíaca después de infarto de miocardio, trombosis cardíaca relacionada con condición tal como aneurisma cardíaco, la fibrosis miocárdica, ampliación cardíaca e insuficiencia, miocarditis y superficie artificial en el corazón;

- Tromboembolismo en pacientes con enfermedad cardíaca valvular con o sin fibrilación auricular;

- Tromboembolismo en prótesis biológicas mecánicas o valvulares;

5 - Tromboembolismo en pacientes que tenían parches cardíacos nativos o artificiales, tubos de conducción arteriales o venosos después de que el corazón se repara de malformaciones cardíacas simples o complejas;

- Trombosis venosa y tromboembolismo después de la cirugía de reemplazo de rodilla, la cirugía de reemplazo de cadera y cirugía ortopédica, torácica o abdominal;

10 - Trombosis arterial o venosa después de la neurocirugía incluyendo intervenciones intracraneales y de la médula espinal;

- Trombofilia congénita o adquirida incluyendo, pero no exclusivamente el Factor V Leiden, mutación de la protrombina, antitrombina III, proteína C y deficiencias de proteína S, mutación del factor XIII, disfibrinogenemia familiar, deficiencia congénita de plasminógeno, aumento de los niveles del Factor XI, anemia de células falciformes, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune, enfermedad crónica del intestino, síndrome nefrótico, uremia hemolítica, enfermedad mieloproliferativa, coagulación intra vascular diseminada, hemoglobinuria paroxística nocturna y trombopenia inducida por heparina;

- Trombosis y tromboembolismo en la enfermedad renal crónica; y

20 - Trombosis y tromboembolismo en pacientes sometidos a hemodiálisis y en pacientes sometidos a la oxigenación por membrana extracorpórea.

El término "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que, se altera sustituye o intercambia (a) la región constante, o una porción de la misma, para que el sitio de unión al antígeno (región variable) este unido a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especies, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, *por ejemplo*, una enzima, toxina, hormona, Factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, que este alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón puede ser modificado mediante la sustitución de su región constante con la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido a la sustitución con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad en el reconocimiento del antígeno, mientras que tiene antigenicidad reducida en humanos en comparación con el anticuerpo de ratón original.

El término "variante modificada de forma conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos

nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos, el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptidos, las "variantes modificadas de manera conservadora" incluyen sustituciones individuales, deleciones o adiciones a una secuencia de polipéptido que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), glicina (G); 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); 6) fenilalanina (F), Tirosina (Y), triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, *por ejemplo*, Creighton, Proteínas (1984)). En algunas realizaciones, la expresión "secuencia modificaciones conservadoras" se usa para referirse a las modificaciones de aminoácidos que no afectan de manera significativa o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

El término "epítopo" significa una proteína determinante que puede unirse a un anticuerpo específico. Los epítopos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y

normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a la primera, pero no la segunda se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Se dice que dos anticuerpos "compiten" si se muestra que un anticuerpo se une al mismo epítopo que el segundo anticuerpo en un ensayo de unión competitiva, por cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR se derivan a partir de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también de tales secuencias humanas, *por ejemplo*, las secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de las secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (*por ejemplo*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión con regiones variables en las que tanto el marco y las regiones CDR se derivan a partir de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se preparan usando métodos fagos display para la selección de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano mientras que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la retención de las regiones CDR no humanas y la sustitución de las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos (*es decir*, la región constante, así como las partes de marco de la región variable). Véase, *por ejemplo*, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; and Padlan, Molec. Immun., 31:169-217, 1994. Otros ejemplos de la tecnología de la ingeniería humana incluyen, pero no se limitan a la tecnología Xoma que se describe en US 5.766.886.

Los términos porcentaje de "identidad" o "idéntico" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (*es decir*, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad sobre una región determinada, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), cuando se

comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada según lo medido usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineamiento manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que es al menos de aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, contra la que las secuencias de prueba se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar parámetros del programa por defecto, o pueden ser designados parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de la identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de 20 a 600, por lo general de 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, *por ejemplo*, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482C, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970, por la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, *por ejemplo*, Brent *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia, son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3.389 a 3402; y Altschul *et al.*, (1990) J.

Mol. Biol.215: 403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, Supra). Estos aciertos de las iniciales de la palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que los contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por lo que la puntuación de alineamiento acumulativa puede aumentar. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se utiliza para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de puntuación negativa de residuos; o cuando se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89:10 915, 1989) alineamientos (B) de 50, expectativa (e) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, *por ejemplo*, Karlin y Altschul, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la suma de probabilidad más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput Appl Biosci, 4:11-17, 1988) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2,0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch (J. Mol, Biol 48.:444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en la World Wide web en gcg.com), utilizando ya sea una matriz de Blossom62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Aparte del porcentaje de identidad de secuencia que se ha indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe abajo. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar la secuencia.

El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (*por ejemplo*, un anticuerpo aislado que se une específicamente FXI y/o FXIa está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos FXI y/o FXIa). Un anticuerpo aislado que se une específicamente FXI y/o FXIa puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (*por ejemplo*, IgM, IgE, IgG, tales como IgG1 o IgG4) que es proporcionado por los genes de la región constante de la cadena pesada. Un Isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, donde se han hecho modificaciones para alterar la función Fc, por ejemplo, para aumentar o reducir las funciones efectoras o la unión a los receptores Fc.

El término " k_{Assoc} " o " k_a ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras que el

término " k_{dis} " o " k_d ", como se usa aquí, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. El término " K_D ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de k_d a k_a (es decir, k_d / k_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D de los anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Los métodos para determinar la K_D de un anticuerpo incluyen la medición de resonancia de plasmón superficial utilizando un sistema biosensor tal como un sistema BIACORE™, o la medición de afinidad en solución mediante la valoración de la solución de equilibrio (SET).

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

El término "ácido nucleico" se usa aquí de forma intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos o residuos o enlaces del esqueleto modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a la los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos-2-O-metilo, ácidos péptido-nucleico (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, como se detalla a continuación, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno, más (o todos) los codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.* Nucleic Acid Res. 19: 5081, 1991; Ohtsuka. *et al.*, J. Biol Chem 260: 2605-2608, 1985; y Rossolini *et al.*, Mol Cell Sondas 8: 91-98, 1994).

El término "unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, el término se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción y una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor o secuencia intensificadora está unida operativamente a una

secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula hospedera apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias reguladoras del promotor de la transcripción que se unen operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es *decir*, son de actuación cis.

- 5 Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como potenciadores, no necesitan ser físicamente contiguas o situadas muy cerca de las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

Tal como se utiliza aquí, el término, "optimizado" significa que una secuencia de nucleótidos ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones
10 que son preferidos en la célula de producción o de un organismo, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia
15 "parental". Las secuencias optimizadas en este documento han sido diseñadas para tener codones que son preferidos en células de mamíferos. Sin embargo, la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas o células procariotas también se prevé en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos optimizadas también se conocen como optimizadas.

20 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de origen natural de aminoácidos y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se
25 indique lo contrario, una secuencia de polipéptido particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (*por ejemplo*, un ratón) que es transgénico o
30 transcromosómico para genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado de la misma, anticuerpos aislados de una célula hospedera transformada para expresar el anticuerpo humano, *por ejemplo*, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpo humano recombinante, combinatoria, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implican empalme de la totalidad, una porción de un gen de

inmunoglobulina humana o secuencias con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones CDR marco y se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedera" como se usa en el presente documento.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados (*por ejemplo* : los mamíferos y no mamíferos), tales como los primates no humanos (*por ejemplo* : macaco), ovejas, conejos, perros, vacas, pollos, anfibios, y reptiles. Excepto cuando se indique, los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan aquí de forma intercambiable. En la presente memoria, los términos "CYNO" o "cynomolgus" se refieren a los monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*). En aspectos específicos, un paciente o sujeto es un ser humano.

Tal como se utiliza aquí, el término "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno (*por ejemplo*, un trastorno tromboembólico) se refiere a una realización, para mejorar la enfermedad o trastorno (*es decir*, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra forma de realización "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluidos los que pueden no ser discernibles por el paciente. En aún otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulación de la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (*por ejemplo*, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (*por ejemplo*, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retrasar la aparición o el desarrollo o la progresión de la enfermedad o trastorno.

"Prevención" lo que se refiere a las indicaciones descritas en el presente documento, incluyendo, *por ejemplo*, un trastorno tromboembólico, Cualquier acción que previene o retarda un empeoramiento de *por ejemplo*, parámetros tromboembólicos de la enfermedad, como se describe a continuación, en un paciente en riesgo de dicho empeoramiento.

5 El término "vector" pretende referirse a una molécula de un polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, tal como un vector viral adeno-asociado (AAV, o AAV2), en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos
10 vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la que se introducen (*por ejemplo*, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (*por ejemplo*, no vectores de mamíferos episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedera tras la introducción en la célula hospedera, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedero. Además,
15 ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la
20 forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (*por ejemplo*, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 **Las Figuras 1A-C** muestran el efecto de NOV1401 en la trombosis inducida por FeCl_3 en ratones FXI^{-/-} reconstituidos con proteína FXI humana. Trombosis inhibida NOV1401 dosis-dependiente. El anticuerpo prolonga aPTT en la misma medida que en ratones no tratados FXI^{-/-}.

30 **Las Figuras 2A-B** muestran el efecto de múltiples dosis intravenosas (iv) (A; N = 2) o subcutánea (sc) (B; N = 2) de 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg NOV1401 en TTPa (diamantes) y su relación con el total de los niveles de plasma NOV1401 (cuadrados) en macacos cynomolgus. Una dosis única de 3 mg/kg dio lugar a ~ 2x aPTT que se mantuvo durante 5-6 semanas. Todas las dosis probadas prolongaron TTPa en un grado similar, y dosis más altas

probadas no parecieron aumentar la magnitud de la prolongación del TTPa observados a la dosis de 3 mg/kg.

Las Figuras 3A-B muestran el efecto de dosis de iv múltiple (A; N = 2) o sc (B; N = 2) de 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg / NOV1401 kg en plasma libre de FXI (cuadrados) y la relación con TTPA (diamantes) en macacos cynomolgus. Una sola dosis de 3 mg/kg redujo FXI libre en aproximadamente un 90% durante 5-6 semanas. Todas las dosis ensayadas redujeron FXI libre en un grado similar, y dosis más altas probadas no parecen aumentar la magnitud de la reducción de FXI libre observada con la dosis de 3 mg/kg.

Las figuras 4A-B muestran la estructura de rayos X del Fab del anticuerpo NOV1401 de la invención unido a FXI. **Figura 4A** muestra la estructura de rayos X del complejo de CD NOV1401 Fab-FXI. El dominio catalítico de FXI se muestra como superficie gris, los Fab como la cinta en gris claro (cadena ligera) y gris oscuro (cadena pesada). **La figura 4B** muestra la estructura de rayos X del complejo de CD NOV1401 Fab-FXI en superposición con el zimógeno FXI. El dominio catalítico de FXI se muestra como la cinta en gris. Los dominios variables de los Fab se muestran como una cinta en color gris claro (VL) y gris oscuro (VH). La estructura del zimógeno esta superpuesta incluyendo los cuatro dominios de manzana como cinta gris oscuro en la parte inferior de la estructura (AP 2F83). Se indica el sitio de escisión de activación (Ile370).

Las Figuras 5A-B muestran los cambios estructurales de FXIa después de la unión a NOV1401 Fab. **La Figura 5A** muestra una vista del sitio activo FXIa antes de la unión a Fab. FXIa se representa como una cinta con una superficie transparente. Secciones de la estructura que cambian de conformación sobre la fijación del Fab fueron etiquetadas (loop145, loop188, y loop220). El S1 y los plegamientos S1 ' están indicados. **La Figura 5B** muestra la conformación inactiva de FXI en el complejo Fab (Fab no mostrado).

Las Figuras 6A-C muestran curvas de respuesta del compuesto de un anticuerpo anti-FXI/FXIa. **La Figura 6A** muestra la inhibición de la actividad del Factor XIa por NOV1401. Una curva representativa de la respuesta del compuesto del anticuerpo NOV1401 inhibiendo la actividad enzimática de FXIa humano de longitud completa. El ensayo mide la escisión de un péptido marcado fluorescentemente como se describe en el ejemplo 3. Utilizando el ajuste de curva no lineal con un modelo de ajuste logístico [$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x / IC50)^p$), donde y es el % Inhibición a la concentración de inhibidor, x. A1 es el valor más bajo de inhibición, y A2 el valor máximo de inhibición. El exponente, p, es el coeficiente de Hill] en este conjunto de datos representativo que conduce a un valor IC_{50} de 160 pM. **La figura 6B** muestra una curva de respuesta del compuesto TTPA. Una curva representativa de la respuesta del compuesto del

anticuerpo NOV1401 prolongando el tiempo de coagulación en el ensayo de TTPA usando plasma humano agrupado. El ensayo mide el tiempo para la coagulación, después de iniciar la cascada de coagulación intrínseca en presencia de diferentes concentraciones de NOV1401, como se describe en el Ejemplo 4. La línea de color negro representa un ajuste mediante un modelo de ajuste no lineal. La línea de puntos representa el tiempo de coagulación basal de plasma humano en ausencia de NOV1401. El tiempo de coagulación basal es de 32,3 segundos, y se indica con una línea discontinua de color gris en el gráfico. La línea punteada gris indica la concentración de anticuerpos en la que el tiempo de coagulación se duplicó en comparación con el valor basal, es *decir*, el valor 2 x TTPA, que es 14 nM. **La figura 6C** muestra una curva de respuesta TGA. Se muestra una curva representativa de la respuesta del compuesto del anticuerpo NOV1401 inhibiendo la generación de trombina en el TGA con plasma humano. El ensayo mide los efectos de diferentes concentraciones de NOV1401 sobre la generación de trombina dependiente de FXI a través del llamado bucle de retroalimentación trombina → FXIa que puede ser activado por concentraciones del Factor tisular muy bajas (TF) como se describe en el Ejemplo 4. La línea negra representa un ajuste usando un modelo de curva de dosis-respuesta de cuatro parámetros. La línea punteada representa la concentración de trombina residual debido a la generación de trombina inducida por pequeñas cantidades de TF. Un valor IC_{50} de 24 nM y una concentración de trombina residual de 159 nM (línea punteada) se calcularon para esta curva de respuesta del compuesto

Las Figuras 7A-B muestran el efecto de dosis semanales de 10 mg/kg (N = 3) y 100 mg/kg (N = 5) sc de NOV1401 durante 13 semanas (14 dosis) o en 50 mg/kg (N = 3) iv durante 4 semanas (5 dosis) sobre aPTT y la actividad FXI (FXI: C). **la figura 7A** muestra el efecto sobre aPTT, medido en días de estudio 2, 23, y 79. El aPTT aumentado de 2.1- a 3 veces en todos los animales que recibieron NOV1401 y permaneció elevado durante toda la fase de dosificación del estudio. No se observó ninguna dependencia de la dosis y no se observaron diferencias relacionadas con el género. **La figura 7B** muestra el efecto sobre el FXI: C, medido en días de estudio 2, 23 y 79 y representado como porcentaje de actividad FXI en plasma. FXI: C disminuyó en todos los animales que recibieron NOV1401 a niveles de 5 a 12% y se mantuvo a estos niveles a lo largo de la fase de dosificación del estudio. No se observó ninguna dependencia de la dosis y no se observaron diferencias relacionadas con el género.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a FXIa e inhiben sus actividades biológicas. La invención se refiere tanto a los anticuerpos completos de formato IgG, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como fragmentos Fab (*por ejemplo*, anticuerpos NOV1090 y NOV1401).

En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, humano, conejo y mono cynomolgus FXI y/o FXIa), composiciones farmacéuticas, métodos de producción, y métodos de uso de tales anticuerpos y composiciones.

Factor XI

FXI tiene un papel importante en ambas vías de la coagulación intrínseca y extrínseca y en la reducción de la iniciación y la amplificación de las fases de la hemostasia plasmática. Tanto el Factor XIIa como la trombina pueden activar FXI, dando como resultado una inhibición sostenida de generación de trombina y la fibrinólisis. FXI juega un papel menor en la hemostasia normal en un entorno de alto Factor tisular "después de la lesión del vaso", mientras que parece desempeñar un papel clave en la trombosis. La deficiencia grave de Factor XI se asocia con una menor incidencia de accidente cerebrovascular isquémico y eventos tromboembólicos venosos (Salomon et al 2008; Salomon, *et al.* (2011) *Haemost.*; 105: 269-73). Las manifestaciones de sangrado en sujetos con deficiencia severa de Factor XI son poco frecuentes, a menudo leves, inducida por lesiones y que afectan preferentemente tejidos con aumento de la actividad fibrinolítica tal como la mucosa oral, mucosa nasal y el tracto urinario (Salomon et al 2011). La hemorragia en los órganos críticos es extremadamente raro o no existente.

La coagulación de plasma es un proceso secuencial mediante la que los factores de coagulación en la sangre interactúan y se activan, en última instancia resulta en la generación de fibrina y formación de coágulos. En el modelo de cascada clásica de la coagulación, el proceso de la generación de fibrina puede ser iniciado por dos vías distintas, *es decir*, la intrínseca y la vía extrínseca, respectivamente (Mackman, 2008).

En la vía extrínseca, la lesión de los vasos permite al factor tisular extravascular (TF) activar e interactuar con el Factor VII (FVII), que secuencialmente conduce a la activación del Factor X y protrombina. La trombina activa en última instancia, convierte el fibrinógeno soluble en fibrina. La vía extrínseca es central para la hemostasia, lo que interfiere con los Factores de coagulación en esta vía, dando como resultado un riesgo de hemorragia.

En la vía intrínseca, el factor XII en algunos casos puede ser activado por un proceso conocido como activación por contacto. La generación de un factor activado XIIa conduce a las activaciones secuenciales del Factor XI y Factor IX. Como el Factor IXa activa el Factor X, las vías intrínsecas y extrínsecas convergen en esta etapa (en la vía común). La actividad de la trombina se refuerza mediante la amplificación de su propia generación a través de un circuito de alimentación de avance en el que la trombina activa el Factor XI independientemente del Factor XII. Este bucle de alimentación de avance contribuye al crecimiento sostenido del trombo, pero sólo está implicada mínimamente en la hemostasis, ya que la fuerte activación por el Factor tisular extravascular es suficiente para la formación de coágulos. La vía intrínseca, por lo tanto, no está involucrada sustancialmente en la hemostasia (Gailani y Renné (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27 (12): 2507-13, Müller, Gailani, y Renné 2011).

Los estudios preclínicos que usan una variedad de enfoques para inhibir FXI o FXIa través de una variedad de especies han contribuido a la validación de este objetivo. Los ratones FXI - / - son resistentes a la trombosis experimental venosa (Wang, et al. (2006) *J Thromb Haemost*; 4:1982-8) y arterial (Wang, et al. (2005) *J Thromb Haemost*; 3:695-702). El tratamiento de ratones con un anticuerpo (Ab, 14E11) que bloquea la activación de FXI por FXIa, dio como resultado la inhibición de la trombosis experimental (Cheng, et al. (2010) *Blood*, 116: 3981-9) y redujo el tamaño del infarto cerebral en un modelo de accidente cerebrovascular isquémico en ratón (Leung, et al. (2012) *Stroke Transl Res* 2012; 3: 381-9). En los babuinos administrados con un anticuerpo anti-FXI Ab que bloquea la unión y la activación de FIX por FXIa, se observó un crecimiento reducido de los trombos ricos en plaquetas en injertos vasculares revestidos con colágeno (Tucker, et al. (2009) *Blood* 2009; 113: 936-44). Resultados similares fueron encontrados con 14E11 en este modelo (Cheng 2010). No se observó sangrado excesivo en ninguno de estos estudios.

El bloqueo de la síntesis de FXI con oligonucleótidos antisentido en ratones (Zhang, et al. (2010) *Blood* 2010; 116: 4684-92), monos cynomolgus (Younis, et al. (2012) *Blood* 2012; 119: 2401-8), y babuinos (Crosby, et al. (2013) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 1670-8) resultó en efectos antitrombóticos y anticoagulantes sin sangrado excesivo. Además, efectos similares han sido producidos mediante el bloqueo de FXIa con inhibidores de bajo peso molecular en modelos venosos y arteriales de trombosis en ratas (Schumacher, et al. (2007) *Eur J Pharmacol* 2007; 570: 167-74) y conejos (Wong, et al. (2011) *J Thromb Trombolysis* 2011; 32: 129-37).

Los pacientes con deficiencia severa de FXI rara vez sangran espontáneamente y solo muestran hemorragia inducida por trauma leve, excepto en los tejidos con alta actividad

fibrinolítica. La rareza de una deficiencia severa de FXI necesita el uso de una población de estudio para revelar el perfil trombótico de estos pacientes en relación con la población general. Cabe destacar que este tipo de estudios informan de la incidencia de accidente cerebrovascular isquémico (Salomon 2008) y la trombosis venosa profunda (TVP) (Salomon, *et al.* (2011) Blood 2008; 111: 4113-17) se reduce en estos pacientes. Por lo tanto, el número de accidentes cerebrovasculares isquémicos (N = 1) observados en 115 pacientes con deficiencia severa de FXI fue menor ($p < 0,003$) que la incidencia esperada (N = 8,6) en la población general de Israel, mientras que la incidencia de la TVP (N = 0) fue menor ($p < 0,019$) en los pacientes con deficiencia severa de FXI de lo esperado en la población control (N = 4,7). Por el contrario, los individuos con niveles de FXI por encima del percentil 90 tenían un riesgo dos veces mayor de desarrollar trombosis venosa profunda (Meijers, *et al.* (2000) N Engl J Med 2000; 342: 696-701).

Recientemente, los pacientes sometidos a reemplazo total de rodilla, un procedimiento que predispone a la trombosis venosa profunda, fueron tratados con la terapia antisentido FXI o la terapia de atención estándar (enoxaparina). El grupo antisentido (300 mg) mostró 7 veces menor incidencia en la trombosis venosa y menores (no significativo) eventos de hemorragia en comparación con la terapia de atención estándar (Büller *et al.*, (2014) N Engl J Med. 372(3):232-40. doi: 10.1056/NEJMoa1405760. Epub 2014 Dec 7).

Tomados en conjunto, estos estudios apoyan firmemente al FXI como un objetivo válido para la terapia antitrombótica.

Anticuerpos FXIa y fragmentos de unión a antígeno

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a FXI y/o FXIa. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a FXI y/o FXIa de humano, conejo y mono cynomolgus. Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos monoclonales humanos y Fab, aislados como se describe en los Ejemplos.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, humano, conejo, y el mono cynomolgus FXI y/o FXIa), en donde los anticuerpos comprenden un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 9 y 29. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína FXI y/o FXIa, en donde que los anticuerpos comprenden una VH CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los VH CDRs enumerados en la Tabla 1, *infra*. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, FXI y/o FXIa humano, conejo, y de mono cynomolgus), en el que los anticuerpos comprenden (o alternativamente, consisten en)

uno, dos, tres o más CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de los VH CDRs enumerados en la Tabla 1, *infra*.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína FXIa, dichos anticuerpos comprenden un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 19 o 39. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, un FXI y/o FXIa de humano, conejo, y mono cynomolgus), dichos anticuerpos que comprenden una VL CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de la VL CDRs enumeradas en la Tabla 1, *infra*. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína FXIa (*por ejemplo*, FXI y/o FXIa de humano, conejo, y mono cynomolgus), dichos anticuerpos que comprende (o alternativamente, que consiste en) uno, dos, tres o más VL CDRs que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL listados en la Tabla 1, *infra*.

Otros anticuerpos de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados, pero tienen al menos 60, 70, 80, 85, 90 o 95 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones CDR, en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1.

La presente invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa, y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, FXIa de humano, conejo, y mono cynomolgus). Tales secuencias de ácido nucleico pueden ser optimizadas para la expresión en células de mamífero (por ejemplo, la Tabla 1 muestra las secuencias de ácido nucleico optimizadas para la cadena pesada y ligera de los anticuerpos de la invención).

Tabla 1. Ejemplos de anticuerpos FXIa, Fabs, y proteínas FXIa.

Descripción de la secuencia	ID de la Secuencia (SEQ ID	Secuencia de aminoácidos o polinucleotidos
-----------------------------	----------------------------	--

	NO:)	
Secuencia completa de la proteína FXIa humana (NCBI Secuencia de referencia: AAA51985)	1	MIFLYQVVHF ILFTSVSGEC VTQLLKDTCF EGGDITTVFT PSAKYCQVVC TYHPRCLLFT FTAESPSEDP TRWFTCVLKD SVTETLPRVN RTAAISGYSF KQCSHQISAC NKDIYVDLDM KGINYNSSVA KSAQECQERC TDDVHCHFFT YATRQFPSLE HRNICLLKHT QTGTPTRITK LDKVVSGFSL KSCALSNLAC IRDIFPNTVF ADSNIDSVMA PDAFVSGRIC THHPGCLFFT FFSQEWPKEs QRNLCLLKTS ESGLPSTRIK KSKALSGFSL QSCRHSIPVF CHSSFYHDTD FLGEELDIVA AKSHEACQKL CTNAVRCQFF TYTPAQASCN EGKGKCYLKL SSNGSPTKIL HGRGGISGYT LRLCKMDNEC TTKIKPRIVG GTASVRGEWP WQVTLHTTSP TQRHLCGGSI IGNQWILTAA HCFYGVESPK ILRVYSGILN QSEIKEDTSF FGVQEIIHHD QYKMAESGYD IALLKLETTV NYTDSQRPIC LPSKGDRNVI YTDCWVTGWG YRKLRLDKIQN TLQKAKIPLV TNEECQKRYR GHKITHKMIC AGYREGGKDA CKGDSGGPLS CKHNEVWHLV GITSWGEGCA QRERPGVYTN VVEYVDWILE KTQAV
Secuencia complete de nucleótidos FXIa (NCBI Secuencia de referencia: NM_000128.3)	2	AGGCACACAG GCAAAATCAA GTTCTACATC TGTCCCTGTG TATGTCACTT GTTTGAATAC GAAATAAAAT TAAAAAATA AATTCAGTGT ATTGAGAAAG CAAGCAATTC TCTCAAGGTA TATTTCTGAC ATACTAAGAT TTTAACGACT TTCACAAATA TGCTGTACTG AGAGAGAATG TTACATAACA TTGAGAACTA GTACAAGTAA ATATTAAAGT GAAGTGACCA TTTCTACAC AAGCTCATTC AGAGGAGGAT GAAGACCATT TTGGAGGAAG AAAAGCACCC TTATTAAGAA TTGCAGCAAG TAAGCCAACA AGGTCTTTTC AGGATGATTT TCTTATATCA AGTGGTACAT TTCATTTTAT TTACTTCAGT TTCTGGTGAA TGTGTGACTC AGTTGTTGAA GGACACCTGC TTTGAAGGAG GGGACATTAC TACGGTCTTC ACACCAAGCG CCAAGTACTG CCAGGTAGTC TGCACTTACC ACCCAAGATG TTTACTCTTC ACTTTACCGG CGGAATCACC ATCTGAGGAT CCCACCCGAT GGTTTACTTG TGTCCTGAAA GACAGTGTTA CAGAAACACT GCCAAGAGTG AATAGGACAG CAGCGATTTT TGGGTATTCT TTCAAGCAAT GCTCACACCA AATAAGCGCT TGCAACAAAG ACATTTATGT GGACCTAGAC ATGAAGGGCA TAAACTATAA CAGCTCAGTT GCCAAGAGTG CTCAAGAATG CCAAGAAAGA TGCACGGATG ACGTCCACTG CCACTTTTTT ACGTACGCCA CAAGGCAGTT TCCCAGCCTG GAGCATCGTA ACATTTGTCT ACTGAAGCAC

		ACCCAAACAG GGACACCAAC CAGAATAACG AAGCTCGATA
		AAGTGGTGTC TGGATTTTCA CTGAAATCCT GTGCACTTTC
		TAATCTGGCT TGTATTAGGG ACATTTTCCC TAATACGGTG
		TTTGCAGACA GCAACATCGA CAGTGTCATG GCTCCCGATG
		CTTTTGTCTG TGGCCGAATC TGCACTCATC ATCCCGGTTG
		CTTGTTTTTT ACCTTCTTTT CCCAGGAATG GCCCAAAGAA
		TCTCAAAGAA ATCTTTGTCT CCTTAAACAA TCTGAGAGTG
		GATTGCCCAG TACACGCATT AAAAAGAGCA AAGCTCTTTC
		TGGTTTCAGT CTACAAAGCT GCAGGCACAG CATCCCAGTG
		TTCTGCCATT CTTCATTTTA CCATGACACT GATTTCTTGG
		GAGAAGAACT GGATATTGTT GCTGCAAAAA GTCACGAGGC
		CTGCCAGAAA CTGTGCACCA ATGCCGTCCG CTGCCAGTTT
		TTTACCTATA CCCCAGCCCA AGCATCCTGC AACGAAGGGA
		AGGGCAAGTG TTACTTAAAG CTTTCTTCAA ACGGATCTCC
		AACTAAAATA CTTACGCGGA GAGGAGGCAT CTCTGGATAC
		ACATTAAGGT TGTGTAAAT GGATAATGAG TGTACCACCA
		AAATCAAGCC CAGGATCGTT GGAGGAACTG CGTCTGTTCTG
		TGGTGAGTGG CCGTGGCAGG TGACCCTGCA CACAACCTCA
		CCCCTCAGA GACACCTGTG TGGAGGCTCC ATCATTGGAA
		ACCAGTGGAT ATTAACAGCC GCTCACTGTT TCTATGGGGT
		AGAGTCACCT AAGATTTTGC GTGTCTACAG TGGCATTTTA
		AATCAATCTG AAATAAAAGA GGACACATCT TTCTTTGGGG
		TTCAAGAAAT AATAATCCAT GATCAGTATA AAATGGCAGA
		AAGCGGGTAT GATATTGCCT TGTTGAACT GGAAACCACA
		GTGAATTACA CAGATTCTCA ACGACCCATA TGCCTGCCTT
		CCAAAGGAGA TAGAAATGTA ATATACACTG ATTGCTGGGT
		GACTGGATGG GGGTACAGAA AACTAAGAGA CAAAATACAA
		AATACTCTCC AGAAAGCCAA GATACCCTTA GTGACCAACG
		AAGAGTGCCA GAAGAGATAC AGAGGACATA AAATAACCCA
		TAAGATGATC TGTGCCGGCT ACAGGGAAGG AGGGAAGGAC
		GCTTGCAAGG GAGATTCGGG AGGCCCTCTG TCCTGCAAAC
		ACAATGAGGT CTGGCATCTG GTAGGCATCA CGAGCTGGGG
		CGAAGGCTGT GCTCAAAGGG AGCGGCCAGG TGTTTACACC
		AACGTGGTCG AGTACGTGGA CTGGATTCTG GAGAAAACCTC
		AAGCAGTGTG AATGGGTTCC CAGGGGCCAT TGGAGTCCCT
		GAAGGACCCA GGATTTGCTG GGAGAGGGTG TTGAGTTCAC
		TGTGCCAGCA TGCTTCCTCC ACAGTAACAC GCTGAAGGGG
		CTTGGTGTTT GTAAGAAAAT GCTAGAAGAA AACAACTGT

		CACAAGTTGT TATGTCCAAA ACTCCCGTTC TATGATCGTT GTAGTTTGTGTT TGAGCATTCA GTCTCTTTGT TTTTGATCAC GCTTCTATGG AGTCCAAGAA TTACCATAAG GCAATATTTT TGAAGATTAC TATATAGGCA GATATAGCAG AAAATAACCA AGTAGTGGCA GTGGGGATCA GGCAGAAGAA CTGGTAAAAG AAGCCACCAT AAATAGATTT GTTCGATGAA AGATGAAAAC TGGAAGAAAG GAGAACAAAG ACAGTCTTCA CCATTTTGCA GGAATCTACA CTCTGCCTAT GTGAACACAT TTCTTTTGTA AAGAAAGAAA TTGATTGCAT TTAATGGCAG ATTTTCAGAA TAGTCAGGAA TTCTTGTCAT TTCCATTTTA AAATATATAT TAAAAAAAAT CAGTTCGAGT AGACACGAGC TAAGAGTGAA TGTGAAGATA ACAGAATTTT TGTGTGGAAG AGGATTACAA GCAGCAATTT ACCTGGAAGT GATACCTTAG GGGCAATCTT GAAGATACAC TTTCTGAAA AATGATTTGT GATGGATTGT ATATTTATTT AAAATATCTT GGGAGGGGAG GCTGATGGAG ATAGGGAGCA TGCTCAAACC TCCCTAAGAC AAGCTGCTGC TGTGACTATG GGCTCCCAA GAGCTAGATC GTATATTTAT TTGACAAAAA TCACCATAGA CTGCATCCAT ACTACAGAGA AAAAACAATT AGGGCGCAAA TGGATAGTTA CAGTAAAGTC TTCAGCAAGC AGCTGCCTGT ATTCTAAGCA CTGGGATTTT CTGTTTCGTG CAAATATTTA TCTCATTATT GTTGTGATCT AGTTCAATAA CCTAGAATTT GAATTGTCAC CACATAGCTT TCAATCTGTG CCAACAATA TACAATTCAT CAAGTGTG
NOV1090		
HCDR1 (Kabat)	3	TAAMS
HCDR2 (Kabat)	4	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (Kabat)	5	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (Chothia)	6	GFTFSTA
HCDR2 (Chothia)	7	SGSGSS
HCDR3 (Chothia)	8	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (IMGT)	43	GFTFSTAA
HCDR2 (IMGT)	44	ISGSGSST
HCDR3 (IMGT)	45	ARELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (Combinado)	46	GFTFSTAAMS
HCDR2 (Combinado)	4	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (Combinado)	5	ELSYLYSGYYFDY

VH	9	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	10	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCGG GTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGATTACCTT TTCTACTGCTGCTATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCAAA GGTCTCGAGTGGGTTTCCGGTATCTCTGGTTCTGGTTCTTCTA CCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCG CGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGTGT CTTACCTGTACTCTGGTTACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGG CACCTGGTGACTGTTAGCTCA
Cadena pesada	11	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
AND que codifica la cadena pesada	12	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCGG GTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGATTACCTT TTCTACTGCTGCTATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCAAA GGTCTCGAGTGGGTTTCCGGTATCTCTGGTTCTGGTTCTTCTA CCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCG CGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGTGT CTTACCTGTACTCTGGTTACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGG CACCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG

		GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
LCDR1 (Kabat)	13	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (Kabat)	14	KNYNRPS
LCDR3 (Kabat)	15	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (Chothia)	16	SSSNIGSND
LCDR2 (Chothia)	17	KNY
LCDR3 (Chothia)	18	WDQRQFDV
LCDR1 (IMGT)	47	SSNIGSND
LCDR2 (IMGT)	37	KNY
LCDR3 (IMGT)	15	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (Combinado)	33	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (Combinado)	14	KNYNRPS
LCDR3 (Combinado)	15	SAWDQRQFDVV
VL	19	DIVLTQPPSVSGAPGQRTISCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCSAWDQRQFDVVFGGGTKLTVL
ADN que codifica VL	20	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGG GCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAACAT TGTTCTAACGACGTGTCTTGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACG GCGCCGAAACTGCTGATCTACAAAACTACAACCGCCCCGAGCG GCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGC

		CAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGAT TATTACTGCTCTGCTTGGGACCAGCGTCAGTTCGACGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
Cadena ligera	21	DIVLTQPPSVS GAPGQRVTISCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCSAWDQ RQFDVVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
ADN que codifica la cadena ligera	22	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGG GCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAGCAACAT TG GTTCTAACGACGTGTCTTGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACG GCGCCGAAACTGCTGATCTACAAAACTACAACCGCCCCGAGCG GCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGC CAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGAT TATTACTGCTCTGCTTGGGACCAGCGTCAGTTCGACGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCCAAGGC TGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTT CAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCT ACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCC CGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGC AACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTG AGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGTGCCAGGTCACGCA TGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGT TCA
NOV1401		
HCDR1 (Kabat)	23	TAAMS
HCDR2 (Kabat)	24	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (Kabat)	25	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (Chothia)	26	GFTFSTA
HCDR2 (Chothia)	27	SGSGSS
HCDR3 (Chothia)	28	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (IMGT)	43	GFTFSTAA
HCDR2 (IMGT)	44	ISGSGSST
HCDR3 (IMGT)	45	ARELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (Combinado)	46	GFTFSTAAMS

HCDR2 (Combinado)	4	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (Combinado)	5	ELSYLYSGYYFDY
VH	29	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	30	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTG GCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTT TAGCACCGCCGCTATGAGCTGGGTTTCGACAGGCCCCAGGGAAA GGCCTCGAGTGGGTCTCAGGGATTAGCGGTAGCGGCTCTAGCA CCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAG GGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTG AGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCTGA GCTACCTGTATAGCGGCTACTACTTCGACTACTGGGGTCAAGG CACCTGGTCACCGTGTCTAGC
Cadena pesada	31	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	32	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTG GCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTT TAGCACCGCCGCTATGAGCTGGGTTTCGACAGGCCCCAGGGAAA GGCCTCGAGTGGGTCTCAGGGATTAGCGGTAGCGGCTCTAGCA CCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAG GGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTG AGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCTGA GCTACCTGTATAGCGGCTACTACTTCGACTACTGGGGTCAAGG CACCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCC GTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCA CAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCC TGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTG CACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCC

		TGTCCTCCGTGGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAG GTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCTCCCTGCCCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGGCCCTTC TGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC TCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCC ACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTAC AACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAA CAAGGCCCTGGCCGCCCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCC AAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCA GCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAG TCTAACGGCCAGCCTGAGAACAATAAGACCAACCCCTCCTG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTAAGTCCAACTGAC CGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGC TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAG
LCDR1 (Kabat)	33	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (Kabat)	34	KNYNRPS
LCDR3 (Kabat)	35	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (Chothia)	36	SSSNIGSND
LCDR2 (Chothia)	37	KNY
LCDR3 (Chothia)	38	WDQRQFDV
LCDR1 (IMGT)	47	SSNIGSND
LCDR2 (IMGT)	37	KNY
LCDR3 (IMGT)	15	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (Combinado)	33	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (Combinado)	14	KNYNRPS
LCDR3 (Combinado)	15	SAWDQRQFDVV
VL	39	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAD YYCSAWDQRQFDVVFGGGTKLTVL
ADN que codifica VL	40	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTG GTCAAAGAGTGACTATTAGCTGTAGCGGCTCTAGCTCTAATAT CGGCTCTAACGACGTCAGCTGGTATCAGCAGCTGCCCCGGCACC

		GCCCCTAAGCTGCTGATCTATAAGAACTATAATAGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGGTTTAGCGGATCTAAATCAGGGACTTCTGC TAGTCTGGCTATTAGCGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGAC TACTACTGTAGCGCCTGGGATCAGCGTCAGTTCGACGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG
Cadena ligera	41	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAD YYCSAWDQRQFDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
ADN que codifica la cadena ligera	42	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTG GTCAAAGAGTGACTATTAGCTGTAGCGGCTCTAGCTCTAATAT CGGCTCTAACGACGTCAGCTGGTATCAGCAGCTGCCCCGGCACC GCCCCTAAGCTGCTGATCTATAAGAACTATAATAGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGGTTTAGCGGATCTAAATCAGGGACTTCTGC TAGTCTGGCTATTAGCGGCCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGAC TACTACTGTAGCGCCTGGGATCAGCGTCAGTTCGACGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGC TGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTG CAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCT ACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGC AACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCG AGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCA CGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGC AGC

Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos en los que se han mutado los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos, sin embargo, tienen al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 por ciento de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1. Algunas realizaciones incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones variables cuando se compara con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, mientras que se conserva sustancialmente la misma actividad de unión a antígeno.

Como cada uno de estos anticuerpos se pueden unir a FXI y/o FXIa, la cadena ligera de longitud completa VH, VL, y secuencias de cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) pueden ser "mixtas y emparejadas "para crear anticuerpos de unión a FXI y/o FXIa de la invención. Tales anticuerpos de unión a FXI y/o FXIa "mixto y emparejado" pueden ser probados usando los ensayos de unión conocidos en la técnica, *por ejemplo*, ELISA, y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplos). Cuando estas cadenas están mezcladas y combinadas, una secuencia de VH de un par particular de VH / VL debe ser reemplazado con una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un pareado particular de cadena pesada/cadena ligera de longitud de longitud completa debe ser reemplazada por una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia de VL de un particular apareamiento VH / VL debe ser reemplazado con una secuencia de VL estructuralmente similar. Del mismo modo una cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento particular de una cadena pesada/ cadena ligera de longitud completa debe ser reemplazada por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similares.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o una región de unión a antígeno del mismo, que tiene: un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9 y 29, y que comprende un dominio variable de cadena ligera de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19 y 39, donde el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, FXIa de humano, conejo y mono cynomolgus).

Más específicamente, en ciertos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo aislado o una región de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs : 9 y 29; o 19 y 39, respectivamente.

En una realización específica, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en este documento que se une específicamente a FXI humano y/o FXIa, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y una región variable de cadena ligera, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En una realización específica, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en este documento que se une específicamente a FXI humano y/o FXIa, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 29, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.

En otro aspecto, la invención proporciona (i) un anticuerpo aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para la expresión en una célula de mamífero seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 11 o 31, y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para la expresión en una célula de mamífero seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 21 o 41; o (ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión del mismo antígeno. Más específicamente, en ciertos aspectos, la invención proporciona una región aislada de anticuerpos o la unión al antígeno del mismo que tiene una cadena pesada y una secuencia que comprende aminoácidos de cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NOs: 11 y 31; o 19 y 39, respectivamente.

En una realización específica, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en este documento que se une específicamente a FXI humano y/o FXIa, comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En una realización específica, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en este documento que se une específicamente a FXI humano y/o FXIa, comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y que comprende una región variable de cadena ligera la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

Los términos "región determinante de complementariedad", y "CDR", como se usa en este documento se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de anticuerpos que confieren especificidad de antígeno y la afinidad de unión. En general, hay tres CDR de cada región variable de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Los precisos límites de secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar fácilmente utilizando cualquiera de una serie de esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico," quinta ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD ("Kabat" esquema de numeración), Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 ("Chothia" esquema de numeración), Lefranc *et al.*, (2003) dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 ("IMGT" esquema de numeración), o el sistema "Combinado".

Por ejemplo, en Kabat, los residuos de aminoácidos de CDR del anticuerpo NOV1090 en el dominio variable de cadena pesada (VH) se numeran 31-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2) y 99-111 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR de la cadena ligera del dominio variable (VL) se numeran 22-35 (LCDR1), 51-57 (LCDR2) y 90-100 (LCDR3). Bajo Chothia los aminoácidos de CDR de la VH se numeran 26-32 (HCDR1), 52-57 (HCDR2) y 99-111 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de VL se numeran 25-33 (LCDR1), 51-53 (LCDR2), y 92-99 (LCDR3). Mediante la combinación de las definiciones de CDR de Kabat y Chothia tanto, las CDR consisten en residuos de aminoácidos 26 a 35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2) y 99-111 (HCDR3) en la VH humana y los residuos de aminoácidos 22-35 (LCDR1), 51-57 (LCDR2) y 90-100 (LCDR3) en la LV humana. Mediante la combinación de las definiciones de CDR de Kabat, Chothia y las CDRs "Combinados" consisten en residuos de aminoácidos 26 a 35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2) y 99-108 (HCDR3) en VH humana y residuos de aminoácidos 24 -38 (LCDR1), 54-60 (LCDR2) y 93-101 (LCDR3) en la LV humana. Como otro ejemplo, bajo IMGT, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de cadena pesada (VH) se numeran 26-33 (HCDR1), 51-58 (HCDR2) y 97-108 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR de la cadena ligera del dominio variable (VL) se numeran 27-36 (LCDR1), 54-56 (LCDR2) y 93-101 (LCDR3). Tabla 1 ofrece a modo de ejemplo Kabat, Chothia, Combinados, y IMGT HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 para los anticuerpos anti-FXII/FXIIa, *por ejemplo*, NOV1090 y NOV1401. En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a FXIIa y que comprenden la cadena pesada y de cadena ligera CDR1s, CDR2s, y CDR3 como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de los CDR1s VH de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 3 y 23. Las secuencias de aminoácidos de la VH CDR2s de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 4 y 24. Las secuencias de aminoácidos de la VH CDR3 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 5 y 25. Las secuencias de aminoácidos de los CDR1s VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 13 y 33. las secuencias de aminoácidos de la VL de los anticuerpos CDR2s se muestran en SEQ ID NOs: 14 y 34. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 15 y 35. Estas regiones CDR están delineadas mediante el sistema de Kabat.

Alternativamente, tal como se define mediante el sistema de Chothia (Al-Lazikani. *Et al*, (1997) JMB 273,927-948), las secuencias de aminoácidos de la VH CDR1s de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 6 y 26. Las secuencias de los aminoácidos de VH CDR2s de los anticuerpos, se muestran en SEQ ID NOs: 7 y 27. Las secuencias de aminoácidos de la VH CDR3 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 8 y 28. Las secuencias de aminoácidos

de la VL CDR1s de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 16 y 36. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR2s de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 17 y 37. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR3s de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NOs: 18 y 38.

5 Alternativamente, tal como se define mediante el sistema combinado, las secuencias de aminoácidos de la VH CDR1 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 46. Las secuencias de aminoácidos de la VH CDR2 de los anticuerpos y se muestran en SEQ ID NO: 4. las secuencias de aminoácidos de la VH CDR3 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 5. las secuencias de aminoácidos de la VL CDR1 de los anticuerpos se muestran en la
10 SEQ ID NO: 33. Las secuencias de aminoácidos de la VL CDR2 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 14. Las secuencias de aminoácidos de la VL CDR3 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 15.

Alternativamente, tal como se define mediante el esquema de numeración IMGT, las secuencias de aminoácidos de la VH CDR1 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO:
15 43. Las secuencias de aminoácidos de la VH CDR2 de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 44. Las secuencias de aminoácidos de la VH CDR3 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 45. Las secuencias de aminoácidos de la VL CDR1 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 47. Las secuencias de aminoácidos de la VL CDR2 de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 37. Las secuencias de aminoácidos de la VL CDR3 de los
20 anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 15.

Dado que cada uno de estos anticuerpos se pueden unir a FXI y/o FXIa y que la especificidad de unión al antígeno se proporciona principalmente por las secuencias de las regiones CDR1, 2 y 3, y las secuencias VH CDR1, 2 y 3; VL CDR1, 2 y 3 estas pueden ser "mezcladas y emparejadas" (es decir, CDRs de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y
25 combinar, aunque cada anticuerpo contiene preferiblemente una VH CDR1, 2 y 3 y un VL CDR1, 2 y 3 para crear otras moléculas de unión a FXI y/o FXIa de la invención. Tales anticuerpos de unión a FXI y/o FXIa "mixtos y emparejados" pueden ser probados usando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los ejemplos (*por ejemplo*, ensayos ELISA, SET, BIACORE[™]). Cuando las secuencias VH CDR se mezclan y se emparejan, la
30 CDR1, CDR2 y/o la secuencia CDR3 de una secuencia VH particular, debe ser reemplazada con una secuencia de CDR estructuralmente similar. Del mismo modo, cuando las secuencias VL CDR están mezcladas y combinadas, las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia de VL particular, debe sustituirse por una secuencia de CDR estructuralmente similares. Será fácilmente evidente para el experto en la materia que nuevas secuencias de VL

VH y se pueden crear mediante la sustitución de una o más secuencias de de la región VH y/o VL CDR con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en este documento para los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Además de lo anterior, en una realización, los fragmentos de los anticuerpos de unión descritos en el presente documento pueden comprender una VH CDR1, 2, y 3, o una CDR de VL 1, 2, y 3, en el que el fragmento se une a FXI antígeno y/o FXIa como un solo dominio variable.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden tener las secuencias de cadena pesada y ligera de los Fab descritas en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden tener la secuencia pesada y ligera de NOV1090 y NOV1401.

En otras formas de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente FXI y/o FXIa comprende una región variable de cadena pesada de la CDR1, una región variable de cadena pesada de la CDR2, una región variable de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2, y una región variable de cadena ligera CDR3 como se define por Kabat y se describe en la Tabla 1. En todavía otras formas de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en que se une específicamente FXI y/o FXIa comprende una región variable de cadena pesada de CDR1, una región variable de cadena pesada de CDR2, una región variable de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2, y una región variable de cadena ligera CDR3 como se define por Chothia y descrito en la Tabla 1. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en que se une específicamente a FXI y/o FXIa comprende una región variable de cadena pesada CDR1, una región variable de cadena pesada de CDR2, una región variable de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2 y una región variable de cadena ligera CDR3 como se define por el sistema combinado y se describe en la Tabla 1. En todavía otras formas de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en que se une específicamente FXI y/o FXIa comprende una región variable de cadena pesada CDR1, una región variable de cadena pesada de CDR2, una región variable de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2, y una región variable de cadena ligera CDR3 como se define por IMGT y se describe en la Tabla 1.

En una realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a FXI y/o FXIa que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 3; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 4; una

región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 5; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 13; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID NO: 14; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 15.

5 En una realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a FXI y/o FXIa que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 23; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 24; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 25; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 33; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID NO: 34; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 35.

10 En una realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a FXI y/o FXIa que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 6; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 7; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 8; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 16; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID
15 NO: 17; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 18.

En una realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a FXI y/o FXIa que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 26; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 27; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena
20 ligera CDR1 de la SEC ID NO: 36; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEC ID NO: 37; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 38.

En una realización específica, proporcionada en este documento es un anticuerpo que se une específicamente a FXI y/o FXIa que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEC ID NO: 43; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 44;
25 una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 45; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 47; una región variable de cadena ligera de CDR2 de la SEC ID NO: 37 y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 15.

En una realización específica, proporcionada en este documento es un anticuerpo que se une específicamente a FXI y/o FXIa que comprende una región variable de cadena pesada
30 CDR1 de la SEC ID NO: 46; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEC ID NO: 4; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 5; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEC ID NO: 33; una región variable de cadena ligera de CDR2 de la SEC ID NO: 14 y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 15.

En ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a FXI y/o FXIa como se describe en la Tabla 1. En una realización preferida, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que se une FXI y/o FXIa es NOV1090 y NOV1401.

5 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o las cadenas pesadas de longitud completa o ligeras que son "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular, si se obtienen las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo de un sistema que utiliza los genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen la
10 inmunización de un ratón transgénico que llevan genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana en phage display con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo
15 humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la inmunoglobulina de la secuencia de la línea germinal humana que es más cercano en secuencia (*es decir*, identidad mayor%) a la secuencia del anticuerpo humano.

Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana en particular puede contener diferencias de
20 aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, de origen natural mutaciones somáticas o introducción intencional de mutaciones sitio-dirigidas. Sin embargo, en las regiones de marco VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la línea germinal de inmunoglobulina humana y contiene residuos de
25 aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como ser humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (*por ejemplo*, secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada
30 por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Típicamente, un anticuerpo humano recombinante mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en las regiones de marco VH o VL. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de diferencia a partir

de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la línea germinal de inmunoglobulina. Ejemplos de genes de inmunoglobulina de línea germinal humanos incluyen, pero no se limitan a los fragmentos de la línea germinal de dominio variables que se describen a continuación, así como DP47 y DPK9.

5 Anticuerpos homólogos

En aún otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 1 (*por ejemplo*, SEQ ID NOs: 29, 31, 39, o 41), y el anticuerpo se une a una proteína FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus), y conserva las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 1 como NOV1090 y NOV1401. En aspectos específicos, tales anticuerpos homólogos retienen las secuencias de aminoácidos de CDR descritos en la Tabla 1 (*por ejemplo*, CDR de Kabat, Chothia CDRs, CDRs IMGT, o CDR Combinados).

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un antígeno funcional fragmento de unión del mismo, que comprende una dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9 y 29; el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19 y 39; y el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus). En una realización, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno funcional de la misma, comprende una dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90 %, o al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (*por ejemplo*, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus). En una realización, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno funcional de la misma, comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90 %, o al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; el

dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (por ejemplo, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus). En ciertos aspectos de la invención, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y secuencias LCDR3 como se define por Kabat, por ejemplo SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 13, 14, y 15, respectivamente. En ciertos otros aspectos de la invención, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y secuencias LCDR3 como se define por Chothia, por ejemplo SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 16, 17, y 18, respectivamente. En otros aspectos, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se define por el sistema combinado, por ejemplo SEQ ID NOs: 46, 4, 5, 33, 14, y 15, respectivamente. En otros aspectos, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se define por IMGT, por ejemplo SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 47, 37, y 15, respectivamente.

En otras realizaciones, las secuencias VH y/o VL de aminoácidos pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser idénticas excepto por una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL con alta identidad (*i. E.*, 80% o mayor) con respecto a las regiones VH y VL descritas en la Tabla 1 se puede obtener por mutagénesis (*por ejemplo*, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las SEQ ID NO: 10 o 30 y SEQ ID NOs: 20 y 40, respectivamente, seguidos por la prueba de anticuerpo alterado codificado para la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos en este documento.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa y/o la cadena pesada de longitud completa pueden ser 50% 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias establecidas en la Tabla 1 (*por ejemplo*, SEQ ID NOs: 11 y/o 21, o 31 y/o 41). Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa que tiene alta (*es decir*, 80% o mayor) identidad con las cadenas pesadas de longitud completa de cualquiera de las SEC ID NOs: 11 o 31, y las cadenas ligeras de longitud completa de cualquiera de las SEC ID NOs: 21 o 41, se puede obtener por mutagénesis (*por ejemplo*, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, seguido de la prueba de

anticuerpo alterado codificado para la retener la función utilizando los ensayos funcionales descritos en este documento.

En un aspecto proporcionado en este documento es un anticuerpo aislado, o un fragmento funcional de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 11 y 31; la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 21 y 41; y el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (por ejemplo, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus). En una realización, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno funcional de la misma, comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (por ejemplo, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus). En una realización, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno funcional de la misma, comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; y el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (por ejemplo, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus). En ciertos aspectos de la invención, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se define por Kabat, por ejemplo, SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 13, 14, y 15, respectivamente. En ciertos otros aspectos de la invención, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se define por Chothia, por ejemplo, SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 16, 17, y 18, respectivamente. En otros aspectos, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y secuencias LCDR3 como se define por el sistema combinado, por ejemplo, SEQ ID NOS: 46, 4, 5, 33, 14, y 15, respectivamente. En otros aspectos, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden

además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se define por IMGT, por ejemplo, SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 47, 37, y 15, respectivamente.

En otras formas de realización, la cadena pesada de longitud completa y/o secuencias de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1 (*por ejemplo*, SEQ ID NOs: 12 y/o 22, o 32 y/o 42).

En otras realizaciones, las regiones variables de cadena pesada y/o las regiones variables de las secuencias de nucleótidos de cadena ligera pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias establecidas en la Tabla 1 (*por ejemplo*, SEQ ID NOs: 10 y/o 20, o 30 y/o 40).

En la presente memoria, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (*es decir*, % de identidad es igual al número de posiciones idénticas / número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que han de ser introducidos para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes siguientes.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención además pueden ser utilizadas como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.*, 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-10.

Anticuerpos con modificaciones conservativas

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3, en el que una o más de estas secuencias CDR tienen secuencias de aminoácido específicas, basadas en los anticuerpos aquí descritos o modificaciones conservadas de la misma, y en el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión a FXIa de la invención.

De acuerdo con ello, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que consiste en una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3, en el que: las secuencias de aminoácido de cadena pesada

de la región variable CDR1 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3 y 23, y modificaciones conservativas de la misma; las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de CDR2 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 y 24, y las modificaciones conservativas de la misma; las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 5 y 25, y modificaciones conservativas de la misma; Las secuencias de aminoácidos regiones variables de cadena ligera de CDR1 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13 y 33, y las modificaciones conservativas de la misma; Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de CDR2 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14 y 34, y las modificaciones conservativas de la misma; Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15 y 35, y las modificaciones conservativas de la misma; y el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno a los mismos que se une específicamente FXIa.

Un aspecto, proporcionado en este documento es un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que consiste en una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3, en el que: Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de CDR1 se seleccionan del grupo descrito en la Tabla 1, y las modificaciones conservativas de la misma; las secuencias de ácidos de región variable de cadena pesada de CDR2 amino se seleccionan del grupo descrito en la Tabla 1, y las modificaciones conservativas de la misma; las secuencias de ácidos de región variable de cadena pesada CDR3 amino se seleccionan del grupo descrito en la Tabla 1, y las modificaciones conservativas de la misma; Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de CDR1 se seleccionan del grupo descrito en la Tabla 1, y las modificaciones conservativas de la misma; Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de CDR2 se seleccionan del grupo descrito en la Tabla 1, y las modificaciones conservativas de la misma; Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de CDR3 se seleccionan del grupo descrito en la Tabla 1, y las modificaciones conservativas de la misma; y el anticuerpo o fragmentos de los mismos de unión a antígeno que se une específicamente a FXIa.

En otras realizaciones, el anticuerpo de la invención se optimiza para la expresión en una célula de mamífero, tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa, en el que una o más de estas secuencias tienen secuencias de aminoácidos específicas sobre la base de los anticuerpos descritos en el

presente documento o modificaciones conservadoras de la misma, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de la anticuerpos de unión a FXIa de la invención. De acuerdo con ello, la invención proporciona un anticuerpo aislado optimizado para la expresión en una célula de mamífero que consta de una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa en el que la cadena pesada de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 11 o 31, y modificaciones conservativas de la misma; y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NOS: 21 o 41, y las modificaciones conservativas de la misma; y el anticuerpo se une específicamente a FXI y/o FXIa (por ejemplo, FXIa humano, conejo y mono cynomolgus).

Los anticuerpos que se unen al mismo epítopo

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos FXI y/o FXIa descritos en la Tabla 1. Los anticuerpos adicionales de unión pueden por lo tanto ser identificados en base por su capacidad para competir (*por ejemplo*, para inhibir competitivamente la unión, en una forma estadísticamente significativa, mediante la unión al mismo epítopo o superpuesto) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de unión FXI y/o FXIa (tales como los descritos en la sección de Ejemplos). La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos de la presente invención a una proteína FXI y/o FXIa demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con que el anticuerpo para la unión a FXI y/o FXIa; un anticuerpo de este tipo puede, según la teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o uno no relacionado (*por ejemplo*, con una estructura similar o espacialmente proximal) en la proteína FXI y/o FXIa como el anticuerpo con los que compete. En una cierta realización, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en FXI y/o FXIa como los anticuerpos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo "compite" para la unión cuando el anticuerpo competidor se une al mismo epítopo FXI y/o FXIa como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención (*por ejemplo*, NOV1401 o NOV1090) e inhibe a FXI y/o FXIa de unirse a anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención en más de un 50% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) en presencia de una concentración equimolar del anticuerpo en competencia. Esto puede determinarse, por ejemplo, en un ensayo de unión competitiva, por cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en este documento, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo **no** "compite" con un anticuerpo FXI y/o FXIa o fragmento de unión a antígeno de la invención (*por ejemplo*, NOV1401 o NOV1090) a menos que dicho anticuerpo o fragmento del antígeno de unión del mismo competitivo se una al mismo epítipo FXI y/o FXIa, o a un epítipo FXIa y/o FXI superpuesto, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en competencia no incluye uno que (i) bloquee estéricamente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención de unirse a su diana (*por ejemplo*, si dicho anticuerpo competidor se une a un epítipo FXI y/o FXIa cercano, no solapante y físicamente impide a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención de unirse a su objetivo); y/o (ii) se une a un epítipo FXI y/o FXIa diferente que no se solapan, e induce un cambio conformacional a la proteína FXI y/o FXIa de manera que dicha proteína ya no puede unirse a un anticuerpo FXI y/o FXIa o fragmento de unión a antígeno de la invención de una manera que habría ausencia de dicho cambio conformacional.

Anticuerpos manipulados y modificados

Un anticuerpo de la invención además se puede preparar usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de VL y/o VH que se muestra en el presente documento como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, el cual podría tener propiedades alteradas a partir del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética mediante la modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (VH y/o VL), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética mediante la modificación de residuos dentro de la región constante, por ejemplo, para alterar la función del efector del anticuerpo.

Un tipo de ingeniería de la región variable que puede ser realizada es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las regiones determinantes de la complementariedad de seis cadenas pesadas y ligeras (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que entre secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos específicos que se producen de forma natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con

diferentes propiedades (ver, *por ejemplo*, Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al)

5 Por consiguiente, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3 y 23; secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 y 24;
10 secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 5 y 25, respectivamente; y una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13 y 33; secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14 y 34; y las secuencias
15 CDR3 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15 y 35, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias CDR de VH y VL de anticuerpos monoclonales, sin embargo, pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas
20 o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpo de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal de cadena pesada y ligera de genes de la región variable humana se pueden encontrar en el "VBase" base de datos de secuencia de línea germinal humana (disponible en la World Wide Web en mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth
25 Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; los contenidos de cada una de las cuales se incorporan expresamente en este documento por referencia.

Ejemplos de secuencias de marco para su uso en los anticuerpos de la invención son
30 aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de marco utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, *por ejemplo*, secuencias de consenso y/o secuencias de marco utilizadas por los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias VH CDR1, 2 y 3, y las secuencias VL CDR1, 2 y 3, puede ser injertadas en regiones estructurales que tienen la secuencia idéntica como la que se encuentra en el gen de

inmunoglobulina de línea germinal de la que derivan de la secuencia de marco, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones estructurales que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones marco para mantener o mejorar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (ver, *por ejemplo*, see e.g., U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al). Marcos que se pueden utilizar como andamios sobre los que construir los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se describen en este documento incluyen, pero no se limitan a VH1A, VH1B, VH3, Vk1, VL2, y Vk2. Marcos adicionales se conocen en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en la base de datos VBASE en la World Wide Web en vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1.

Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a anticuerpos de unión a FXIa aislados, o fragmentos de unión a antígeno de unión del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9 y 29, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos sustituciones, deleciones o adiciones de la región marco de tales secuencias, y que comprende además una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19 o 39, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones de la región marco de tales secuencias.

Otro tipo de modificación de la región variable es de mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones / o CDR3 de VH y/o VL CDR1, CDR2 y mejorar de este modo una o más propiedades de unión (*por ejemplo*, afinidad) del anticuerpo de interés, conocido como "afinidad maduración." mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR se puede realizar para introducir la mutación (s) y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se pueden evaluar en *in vitro* o *in vivo* ensayos como se describe en este documento y proporcionado en la sección de Ejemplos. Modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente) se pueden introducir. Las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos, adiciones o supresiones. Por otra parte, por lo general no más de una, dos, tres, cuatro están alterados o cinco residuos dentro de una región CDR.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos aislados de unión FXIa o fragmentos del mismo de unión a antígeno, que consiste en una región variable de cadena pesada que tiene una región VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 3 y 23 o una secuencia de aminoácidos que

tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 3 y 23; una región VH CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 y 24 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs : 4 y 24; una región CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 5 y 25, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con la SEC ID NO: 5 y 25; una región VL CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13 y 33, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 13 y 33; una región VL CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14 y 34, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 14 y 34; y una región CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15 y 35, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 15 y 35.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos aislados de unión FXIa-o fragmentos de unión a antígeno de unión del mismo, que consiste en una región variable de cadena pesada que tiene una región VH CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 6 y 26 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 6 y 26; una región VH CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 7 y 27 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs : 7 y 27; una región CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8 y 28, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos comparación con la SEC ID NOs: 8 y 28; una región VL CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 16 y 36, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos comparación con la SEC ID NOs: 16 y 36; una región VL CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada

del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17 y 37, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos comparación con la SEC ID NOs: 17 y 37; y una región CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 18 y 38, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco, delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 18 y 38.

El injerto de dominios de unión al antígeno en los marcos alternativos o andamios

Una amplia variedad de marcos anticuerpos / inmunoglobulina o andamios pueden ser empleados siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente a FXIa. Tales marcos o andamios incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de las mismas, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, que tiene preferiblemente aspectos humanizados. Anticuerpos de cadenas pesadas individuales, tales como los identificados en los camélidos son de particular interés en este sentido. Marcos, andamios y fragmentos novedosos continúan siendo descubiertos y desarrollados por los expertos en la técnica.

En un aspecto, la invención se refiere a la generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulina utilizando andamios que no son de inmunoglobulina en la que las CDR de la invención se pueden injertar. Marcos conocidos o futuros que no son de inmunoglobulina y andamios se pueden emplear, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína FXI y/o FXIa diana. Marcos conocidos que no son de inmunoglobulina o andamios incluyen, pero no están limitados a, fibronectina (Terapéutica compuestos, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), pequeños inmuno-farmacéuticos modulares (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), La proteína A (Aficuerpo AG, Suecia), y affilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil proteínas GmbH, Halle, Alemania).

Los andamios de fibronectina se basan en el tipo de dominio de fibronectina III (*por ejemplo*, el décimo módulo de la fibronectina tipo III (Fn3 10 dominio)). El dominio de fibronectina de tipo III tiene 7 u 8 hebras beta que están distribuidas entre dos láminas beta, las cuales, se empaquetan una contra la otra para formar el núcleo de la proteína, y además otros bucles (análogas a CDR) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestos al disolvente. Hay al menos tres de tales bucles en cada borde del sándwich de lámina beta, en el que el borde es la frontera de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase el documento US 6.818.418). Estos andamios a base de fibronectina no son una inmunoglobulina,

aunque el pliegue global está estrechamente relacionado con la del fragmento más pequeño funcional de un anticuerpo, la región variable de la cadena pesada, que comprende toda la unidad de reconocimiento de antígeno en camello y llama IgG. Debido a esta estructura, el anticuerpo imita las propiedades de unión al antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos andamios se pueden utilizar en una aleatorización de bucle y la estrategia de barajado *in vitro* que es similar al proceso de maduración de la afinidad de anticuerpos *in vivo*. Estas moléculas basadas en fibronectina se pueden utilizar como andamios, donde las regiones de bucle de la molécula se pueden reemplazar con CDR de la invención usando técnicas de clonación estándar.

La tecnología ankyrin se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición de anquirina derivados como andamios para cojinete de regiones variables que pueden ser utilizados para la unión a diferentes objetivos. El módulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consta de dos alfa-hélices antiparalelas y un giro β -. La unión de las regiones variables se optimiza su mayor parte mediante el uso de la expresión en ribosomas.

Los avimeros se derivan de proteínas que contienen un dominio A natural como LRP-1. Estos dominios son utilizados por la naturaleza de las interacciones proteína-proteína y en el ser humano más de 250 proteínas se basan estructuralmente en los dominios A. Los avimeros consisten en un número de diferentes monómeros "Dominio A " (2-10) unidos a través de enlazadores de aminoácidos. Los avimeros pueden ser creados para unirse al antígeno diana utilizando la metodología descrita en, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de publicación 20040175756.; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

Los ligandos de afinidad de anticuerpos son proteínas pequeñas y sencillas compuestas de un paquete de tres hélices basado en el andamio de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio andamio consta de 58 aminoácidos, 13 de los cuales se asignaron al azar para generar bibliotecas de anticuerpo con un gran número de variantes de ligando (Ver *por ejemplo*, US 5.831.012). Las moléculas de anticuerpo imitan a los anticuerpos, que tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas Anticuerpo es similar a la de un anticuerpo.

Las anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris Proteolab AG. Se derivan de lipocalinas, un grupo extendido de las proteínas pequeñas y robustas que por lo general están involucradas en el transporte fisiológico o almacenamiento de compuestos

químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se producen en los tejidos humanos o líquidos corporales. La arquitectura de la proteína es una reminiscencia de inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas se componen de una única cadena de polipéptido de 160 a 180 residuos de aminoácidos, siendo sólo marginalmente más grande que un único dominio de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra plasticidad estructural pronunciada y tolera una variedad de cadenas laterales. El sitio de unión de este modo puede ser reconfigurado en un proceso patentado a fin de reconocer moléculas diana prescritas de forma diferente con alta afinidad y especificidad. Una proteína de la familia de la lipocalina, la proteína de unión bilin-(BBP) de *Pieris brassicae* ha sido utilizada para desarrollar anticalinas por mutagénesis de la serie de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe anticalinas es en la Publicación PCT No. WO 199916873.

Las moléculas Affilinas son pequeñas proteínas no inmunoglobulinas que están diseñadas para afinidades específicas hacia las proteínas y moléculas pequeñas. Nuevas moléculas de affilinas se pueden seleccionar muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de las cuales se basan en un andamio de proteínas derivado de ser humano diferente. Las moléculas de affilinas no muestran ninguna homología estructural con proteínas de inmunoglobulina. Actualmente, se emplean dos andamios de affilina, uno de los cuales es cristalina gamma, una proteína de la lente del ojo humano estructural y el otro es de las "proteínas de la superfamilia de ubiquitina". Ambos andamios humanos son muy pequeños y muestran estabilidad en altas temperaturas y son casi resistentes a los cambios de pH y agentes desnaturalizantes. Esta alta estabilidad es debida principalmente a la estructura de lámina beta ampliada de las proteínas. Ejemplos de proteínas derivadas cristalinas gamma se describen en WO200104144 y ejemplos de proteínas "tipo ubiquitina" se describen en WO2004106368.

Los miméticos de epítomos de proteína (PEM) son, moléculas cíclicas, de tipo peptídico (MW 1-2kDa) de tamaño mediano que imitan estructuras secundarias beta-horquilla de proteínas, la estructura secundaria más importante implicada en las interacciones proteína-proteína.

La presente invención proporciona anticuerpos completamente humanos que se unen específicamente a una proteína FXIa. En comparación con los anticuerpos quiméricos o humanizados, los anticuerpos de unión a FXIa-humanos de la invención han reducido aún más la antigenicidad cuando se administran a sujetos humanos.

Los anticuerpos de camélidos

Las proteínas de los anticuerpos obtenidos de los miembros de la familia de los camellos y dromedarios (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*), incluyendo los nuevos miembros del mundo tales como las especies de llamas (*Paccos Lama*, *Lama glama* y *vicugna Lama*) se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad en temas humanos. Ciertos anticuerpos de IgG a partir de esta familia de mamíferos como se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas típica que tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, para los anticuerpos de otros animales. Ver PCT / EP93 / 02214 (WO 94/04678 publicada el 3 de marzo de 1994).

Una región del anticuerpo de camélido que es el pequeño dominio variable único identificado como VHH se puede obtener por ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tiene una alta afinidad por una diana, lo que resulta en una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como un "nanocuerpo camélido". Ver la patente estadounidense número 5.759.808 concedida el 2 de junio de 1998; véase también Stijlemans, B. et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; and Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Bibliotecas de ingeniería de anticuerpos de camélidos y fragmentos de anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Ablynx, Gante, Bélgica. Al igual que con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede ser alterado de forma recombinante para obtener una secuencia que se asemeje más a una secuencia humana, es *decir*, los nanocuerpos pueden ser "humanizados". Así, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos de camélidos a los seres humanos puede reducirse aún más.

El nanocuerpo camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de sólo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de nanocuerpos de camélidos de unirse a sitios antígenicos que son funcionalmente invisible a las proteínas de anticuerpo más grandes, es *decir*, los nanocuerpos de camélidos son útiles como reactivos de detección de antígenos que son de otra manera crípticos utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y son posibles agentes terapéuticos. Por lo tanto aún otra consecuencia de su pequeño tamaño es que un nanocuerpo camélido puede inhibir como resultado de la unión a

un sitio específico en una ranura o hendidura estrecha de una proteína diana, y por lo tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco clásico de bajo peso molecular que a la de un anticuerpo clásico.

5 El bajo peso molecular y el tamaño compacto de los nanocuerpos camélidos les permite ser extremadamente termoestables, estables a pH extremo y a la digestión proteolítica, y son pobremente antigénicas. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélidos se mueven fácilmente dentro de los tejidos, en el sistema circulatorio e incluso atraviesan la barrera hematoencefálica y pueden tratar los trastornos que afectan el tejido nervioso. Los nanocuerpos puede facilitar aún más el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Ver
10 la solicitud de patente de EE.UU. 20040161738 publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características Combinadas con la baja antigenicidad para los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden ser expresadas completamente en células procariotas tales como E. coli y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófagos y son funcionales.

15 En consecuencia, una característica de la presente invención es un anticuerpo de camélido o nanocuerpo que tiene una alta afinidad por FXI y/o FXIa. En ciertas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo de camélido o nanocuerpos se produce naturalmente en el animal de camélidos, es *decir*, se produce por el camélido después de la inmunización con FXI y/o FXIa o un fragmento peptídico de la misma, utilizando las técnicas descritas en este
20 documento para otros anticuerpos. Alternativamente, los nanocuerpos vinculantes a FXI y/o FXIa de camélido están diseñado, es *decir*, producidos por selección, por ejemplo, de una biblioteca de fagos que presenta proteínas nanocuerpo de camélidos apropiadamente mutagenizadas utilizando procedimientos panning con FXI y/o FXIa, y/o dominios y/o fragmentos peptídicos de los mismos, como objetivo, como se describe en los ejemplos en el
25 presente documento. Los nanocuerpos se pueden personalizar aún más mediante la ingeniería genética para tener una vida media en un sujeto receptor de entre 45 minutos y dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo de camélido o nanocuerpos se obtienen mediante el injerto de las CDR de secuencias de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos de la invención en secuencias de nanocuerpos o de marco de anticuerpo de dominio único, tal
30 como se describe por ejemplo en PCT / EP93 / 02214.

Moléculas biespecíficas y anticuerpos multivalentes

En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas multiespecíficas o biespecíficas que comprenden un anticuerpo de unión a FXI y/o FXIa, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o regiones de unión a antígeno del

mismo, se puede derivatizar o ligar a otra molécula funcional, *por ejemplo*, otro péptido o proteína (*por ejemplo*, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos a dos diferentes sitios de unión o moléculas diana. El anticuerpo de la invención puede de hecho ser derivatizado o ligado a más de una molécula funcional para generar moléculas multi-específicas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multi-específicas también están destinadas a ser abarcadas por el término "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede estar ligado funcionalmente (*por ejemplo*, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más de otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que resulte en una molécula biespecífica.

En consecuencia, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por FXI y/o FXIa y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. Por ejemplo, el segundo epítipo diana es otro epítipo de FXI y/o FXIa diferente del primera epítipo diana.

Además, la invención en la que la molécula biespecífica es multi-específica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además del primer y segundo epítipo diana.

En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, *por ejemplo*, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser una cadena ligera o dímero de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una sola construcción de cadena como se describe en Ladner *et al.* Patente de Estados Unidos No. 4.946.778.

Los diacuerpos son moléculas bivalentes, biespecíficas en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, conectadas por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios VH y VL están apareados con los dominios complementarios de otra cadena, creando de ese modo dos sitios de unión a antígeno (Holliger *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak *et al.*, 1994 Structure 2:1121-1123). Los diacuerpos pueden ser producidos mediante la expresión de dos cadenas de polipéptidos, ya sea con la estructura VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VHA VLB-(configuración VL-VH) dentro de la misma célula. La mayoría de ellos se puede expresar en forma soluble en

bacterias. Los diacuerpos de cadena sencilla (SCDB) se producen mediante la conexión de las dos cadenas de polipéptidos que forman un diacuerpo-enlazador de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos (véase Holliger and Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(3-4):128-30; Wu et al., 1996 *Immunotechnology*, 2(1):21-36). SCDB puede expresarse en bacterias en forma monomérica soluble, de una manera monomérica activa (véase Holliger and Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(34): 128-30; Wu et al., 1996 *Immunotechnology*, 2(1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997 *Immunotechnology*, 3(2): 83-105; Ridgway et al., 1996 *Protein Eng.*, 9(7):617-21). Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un "di-diacuerpo" (véase Lu et al., 2004 *J. Biol. Chem.*, 279(4):2856-65).

Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Moléculas biespecíficas se pueden preparar conjugando las especificidades de unión constituyentes, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí.

Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación puede ser utilizadas para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen la proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (OPDM), N-succinimidil-3- (2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4- (N-maleimidometil) cyclohexane-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver *por ejemplo*, Karpovsky et al., 1984 *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA et al., 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648) Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, 1985 *Behring Ins. Mitt.* No. 78,118-132; Brennan et al., 1985 *Science* 229:81-83), y Glennie *et al.*, 1987 *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante la unión de sulfhidrilo de las regiones C-terminal de articulación de las dos cadenas pesadas. En una particular forma de realización, la región bisagra es modificada para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y montarse en la misma célula hospedera. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F (ab')² o proteína de fusión ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena única que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una sola molécula biespecífica de cadena que comprende dos determinantes de unión. Las

moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la patente estadounidense número 5.260.203; Patente de Estados Unidos Número 5.455.030; Patente de Estados Unidos Número 4.881.175; Patente de Estados Unidos Número 5.132.405; Patente de Estados Unidos Número 5.091.513; Patente de Estados Unidos Número 5.476.786; Patente de Estados Unidos Número 5.013.653; Patente de Estados Unidos Número 5.258.498; y la patente estadounidense número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos se puede confirmar mediante, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis de FACS, bioensayo (*por ejemplo*, inhibición del crecimiento), o ensayo de Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteínas-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (*por ejemplo*, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de unión a antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos de la unión a FXIa de la invención. Las porciones de unión al antígeno pueden ser unidas entre sí a través de la proteína de fusión o enlace covalente o no covalente. Alternativamente, los métodos de ligamiento se han descrito para las moléculas biespecíficas. Compuestos tetravalentes se pueden obtener por ejemplo por anticuerpos de entrecruzamiento de los anticuerpos de la invención con un anticuerpo que se une a las regiones constantes de los anticuerpos de la invención, por ejemplo, la Fc o región bisagra.

Los dominios trimerizados se describen por ejemplo en la patente Boreal EP 1 012 280B1. Los módulos pentamerizados se describen por ejemplo en el documento PCT / EP97 / 05897.

Los anticuerpos con vida media extendida

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína de FXIa que tiene una vida media prolongada *in vivo*.

Muchos factores pueden afectar la vida media de una proteína *in vivo*. Por ejemplo, la filtración renal, el metabolismo en el hígado, la degradación por enzimas proteolíticas (proteasas), y las respuestas inmunogénicas (*por ejemplo*, neutralización proteínica por anticuerpos y la captación por los macrófagos y las células dendríticas). Una variedad de estrategias puede ser utilizadas para extender la vida media de los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, por unión química de polietilenglicol (PEG), recodificación PEG, andamio anticuerpo, ácido polisialico (PSA), almidón de hidroxietilo (HES), los ligandos de

unión a la albúmina, y escudos de hidratos de carbono; por fusión genética a proteínas de unión a las proteínas séricas, tales como albúmina, IgG, FcRn, y la transferencia; por acoplamiento (genética o químicamente) a otros restos de unión que se unen a las proteínas séricas, tales como nanocuerpos, Fabs, DARPins, avimers, aficuerpos, y anticalins; por fusión genética a RPEG, albúmina, el dominio de la albúmina, proteínas de unión a la albúmina, y Fc; o por incorporación en nanoportadores, formulaciones de liberación lenta, o dispositivos médicos.

Para prolongar la circulación en suero de anticuerpos *in vivo*, las moléculas de polímero inertes, tales como PEG de alto peso molecular se pueden unir a los anticuerpos o a un fragmento del mismo, con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C -terminal de los anticuerpos o por medio de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, por lo general se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al fragmento de anticuerpo o al anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza aquí, el término "polietilenglicol" se pretende que abarque cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) glicol o polietileno alcoxi o ariloxi-polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Se utilizará la derivatización del polímero lineal o ramificado que tiene como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se puede supervisar de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEG a los anticuerpos. PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados de anticuerpo-PEG por exclusión por tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivatizados con PEG pueden analizarse en cuanto a su actividad de unión, así como en cuanto a su eficacia *in vivo* usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por los inmunoensayos descritos en este documento. Métodos para pegilar proteínas se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura *et al.*, Y EP 0 401 384 por Ishikawa *et al.*

Otras tecnologías de pegilación modificados incluyen la tecnología de ingeniería dirigida de reconstitución químicamente ortogonal (ReCODE® PEG), que incorpora cadenas laterales químicamente específicas en proteínas biosintéticas a través de un sistema reconstituido que incluye tRNA sintetasa y ARNt. Esta tecnología permite la incorporación de más de 30 nuevos

aminoácidos en proteínas biosintéticas en *E. coli*, levaduras y células de mamífero. El tRNA incorpora un aminoácido no nativo a cualquier lugar en donde se coloque un codón ámbar, convirtiendo el color ámbar a partir de un codón de parada a uno que indica la incorporación del aminoácido químicamente definido.

5 La tecnología de la pegilación recombinante (RPEG) también se puede utilizar para la extensión de vida media en suero. Esta tecnología implica la fusión genética de una cola proteínica no estructurada de ácido aminos de 300-600 a una proteína farmacéutica existente. Debido a que el peso molecular aparente de una cadena de proteínas, no estructurada es aproximadamente 15 veces más grande que su peso molecular real, la vida media en suero de
10 la proteína se incrementa en gran medida. En contraste con la PEGilación tradicional, que requiere la conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación es en gran medida simplificado y el producto es homogéneo.

 La polisialcion es otra tecnología, que utiliza el ácido polisiálico, polímero natural (PSA) para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de los péptidos y proteínas terapéuticas. El
15 PSA es un polímero de ácido siálico (un azúcar). Cuando se utiliza para el suministro terapéutico de un fármaco peptídico o proteínico, el ácido polisiálico proporciona un microambiente protector sobre la conjugación. Esto aumenta la vida activa de la proteína terapéutica en la circulación y evita que sea reconocida por el sistema inmune. El polímero de PSA se encuentra naturalmente en el cuerpo humano. Fue adoptado por ciertas bacterias que
20 evolucionaron a lo largo de millones de años para recubrir sus paredes con ella. Estas bacterias polisialiladas naturalmente fueron capaces, en virtud de mimetismo molecular, frustrar el sistema de defensa del cuerpo. La última tecnología de sigilo de la naturaleza, el PSA, se puede producir fácilmente a partir de tales bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas. El PSA bacteriano es completamente no inmunogénico,
25 incluso cuando se acopla a las proteínas, ya que es químicamente idéntico a PSA en el cuerpo humano.

 Otra tecnología incluye el uso de derivados de almidón de hidroxietilo vinculados a los anticuerpos ("HES"). HES es un polímero natural modificado derivado de almidón de maíz ceroso y puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Las soluciones de HES se
30 administran normalmente para sustituir el volumen de sangre deficiente y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. El uso de la tecnología HESylation en un anticuerpo permite la prolongación de la vida media de circulación por el aumento de la estabilidad de la molécula, así como mediante la reducción de aclaramiento renal, resultando en un aumento de la actividad biológica. Mediante la variación de diferentes parámetros, tales como el peso

molecular de HES, una amplia gama de conjugados de anticuerpos de HES se puede personalizar.

Los anticuerpos que tienen una mayor vida media *in vivo* también se pueden generar introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (*es decir*, sustituciones, inserciones o deleciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento del mismo de unión a FcRn (preferiblemente un Fc o fragmento bisagra del dominio Fc). Véase, *por ejemplo*, la Publicación Internacional N° WO 98/23289; Publicación Internacional N° WO 97/34631; y la patente de Estados Unidos N° 6.277.375.

Además, los anticuerpos se pueden conjugar a la albúmina (*por ejemplo*, albúmina de suero humano; HSA) con el fin de hacer que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo más estable *in vivo* o que tenga una vida media más larga *in vivo*. Las técnicas son bien conocidas en el área, véase, *por ejemplo*, la Publicación Internacional N° WO 93/15199, WO 93/15200, y WO 01/77137.; y en la Patente Europea N° EP 413.622. Además, en el contexto de un anticuerpo biespecífico tal como se describe anteriormente, las especificidades de anticuerpo pueden ser diseñadas de tal manera que un dominio de unión del anticuerpo se una a FXIa mientras que un segundo dominio de unión del anticuerpo se una a la albúmina sérica, preferiblemente HSA.

Las estrategias para aumentar la vida media son especialmente útiles en nanocuerpos, aglutinantes a base de fibronectina, y otros anticuerpos o proteínas para las que se desea un aumentó *in vivo* de la vida media.

Conjugados de anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a una proteína FXIa recombinantemente fusionados o químicamente conjugados (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a una proteína heteróloga o polipéptido (o fragmento del mismo, preferiblemente a un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en el presente documento (*por ejemplo*, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, F (ab) 2 fragmento, un dominio VH, una VH CDR, un dominio VL o una CDR VL) y una proteína heteróloga, un polipéptido o péptido. Los métodos para fusionar o conjugar las proteínas, polipéptidos o péptidos a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidas en la técnica. Véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos números 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, y 5.112.946.; La patente europea EP 307434 y N°

EP 367.166.; Publicación Internacional N° WO 96/04388 y WO 91/06570.; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154: 5590-5600; y Vil *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 11337- 11341.

Proteínas de fusión adicionales pueden ser generadas a través de las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exónes, y/o barajado de codones (denominados colectivamente como "barajado de ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (*por ejemplo*, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades superiores y velocidades de disociación inferiores). Véase, en general, la patente de Estados Unidos números 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252, y 5.837.458.; Patten *et al.*, 1997, Curr. Opinión Biotechnol. 8: 724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82; Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2): 308- 313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de la misma, pueden ser alterados por ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción de nucleótidos aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína FXIa puede ser recombinado con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tal como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina (SEQ ID NO: 48), tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponible. Como se describe en Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina (SEQ ID NO: 48) proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37: 767), y la etiqueta de "bandera".

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos son conjugados con un agente detectable o de diagnóstico. Tales anticuerpos pueden ser útiles para pronosticar el inicio o el seguimiento, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia en particular. Tal diagnóstico y la detección pueden ser logrados

mediante el acoplamiento del anticuerpo a las sustancias detectables incluyendo, pero no limitandose a, diversas enzimas, tales como, pero no limitado a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no limitado a, streptavidin/biotina y avidina / biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitado a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitado a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no limitado a, la luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no limitado a, el yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I y ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , y ^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn y ^{117}Sn ; y metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos norradioactivos.

La presente invención abarca además los usos de anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un resto terapéutico. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a un resto terapéutico tal como una citotoxina, *por ejemplo*, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, *por ejemplo*, alfa-emisores. Un agente de citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a un resto terapéutico o resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Restos terapéuticos o restos de fármacos no han de interpretarse como limitaciones a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico; o, un modificador de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, una linfoquina.

Además, un anticuerpo puede conjugarse con restos terapéuticos tales como un ion metálico radiactivo, como emisores alfa tales como ^{213}Bi o agentes quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones de metales radiactivos, incluyendo, pero no limitados a, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , para los polipéptidos. En ciertas realizaciones, el quelante

macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N''' - ácido tetraacético (DOTA) que puede ser unido al anticuerpo a través de una molécula de engarce. Tales moléculas de enlace se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem.10 (4): 553-7; y Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Medicina. Biol. 26 (8): 943-50, cada uno incorporado por referencia en su totalidad.

Las técnicas para conjugar restos terapéuticos a los anticuerpos son bien conocidas, véase, *por ejemplo*, Arnón *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Métodos de producción de anticuerpos

Acidos nucleicos que codifica los anticuerpos

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de las cadenas de anticuerpo de unión a FXIa descritos anteriormente. Algunos de los ácidos nucleicos de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 10 o 30, y/o la secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de cadena ligera mostrada en la SEC ID NO: 20 o 40. En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico son las identificadas en la Tabla 1. Algunas otras moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (*por ejemplo*, al menos 65, 80%, 95%, o 99%) a las secuencias de nucleótidos de las identificadas en la Tabla 1. Cuando se expresa a partir de vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de exhibir antígeno con capacidad de unión a FXI y/o FXIa.

También se proporcionan en la invención polinucleótidos que codifican al menos una región CDR y por lo general las tres regiones CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de unión a FXIa establecido anteriormente. Algunos otros polinucleótidos codifican la totalidad o sustancialmente la totalidad de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo de unión a FXIa establecido anteriormente. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificará cada una de las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de ácido nucleico de la invención comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de cadena pesada que es sustancialmente idéntica (*por ejemplo*, al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 11 o 31. Algunas otras secuencias de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera que es sustancialmente idéntica (*por ejemplo*, al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de la cadena ligera expuesta en la SEC ID NO: 21 o 41.

Las secuencias de polinucleótidos pueden producirse por síntesis de ADN de novo en fase sólida o por mutagénesis por PCR de una secuencia existente (*por ejemplo*, las secuencias como se describe en los Ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo de unión a FXIa o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica, tales como el método del fosfotriéster de Narang *et al.*, 1979, Meth. Enzymol.68:90; el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth.Enzymol.68: 109, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetra. Lett, 22: 1859, 1981; y el método de soporte sólido de la Patente US No. 4.458.066. La introducción de mutaciones a una secuencia de polinucleótido por PCR se puede realizar como se describe en, *por ejemplo*, PCR Technology: Principios y Aplicaciones para la Amplificación de ADN, HA Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; Protocolos de PCR: Una guía para Métodos y Aplicaciones, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19: 967, 1991; y Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

También se proporciona en la invención vectores de expresión y células hospederas para la producción de la antivuerpos de union a FXI y/o FXIa descritos anteriormente. Varios vectores de expresión se pueden emplear para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de los fragmentos de anticuerpo de unión a FXIa. Ambos vectores de expresión basados en virus y no virales se pueden utilizar para producir los anticuerpos en una célula hospedera de mamífero. Vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores

episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, *por ejemplo*, Harrington *et al.*, Nat Genet 15: 345, 1997). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos de unión a FXIa y polipéptidos de células de mamíferos (*por ejemplo*, humanos) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1 / His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores de MPSV, y numerosos otros vectores conocidos en la técnica para la expresión de otras proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y el virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent *et al.*, Supra; 10 Smith, Annu. Rev. Microbiol.49: 807, 1995; y Rosenfeld *et al.*, Cell 68: 143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células hospederas deseadas en el que el vector se va a expresar. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (*por ejemplo*, potenciadores) que se une operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena de anticuerpo de unión a FXIa o fragmento. En 15 algunas formas de realización, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, *por ejemplo*, arabinosa, lacZ, el promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inductoras sin sesgar la población para las secuencias cuyos productos de expresión son mejor 20 tolerados por las células hospederas de codificación. Además de los promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesarios o deseados para la expresión eficaz de una cadena de anticuerpo o fragmento de unión a FXIa. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y el sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores 25 apropiados para el sistema celular en uso (véase, *por ejemplo*, Scharf *et al.*, Results Probl Cell Differ 20: 125, 1994; y Bittner *et al.*, Meth. Enzymol, 153: 516, 1987). Por ejemplo, el potenciador de SV40 o promotor de CMV se pueden usar para aumentar la expresión en células hospederas de mamífero.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de la secuencia 30 señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpo de unión a FXIa insertadas. Más a menudo, las secuencias de anticuerpo de unión a FXIa y/o FXI insertadas están ligadas a una secuencia de señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir las secuencias que codifican FXI y/o FXIa de unión ligera de anticuerpo y los dominios variables de cadena pesada a veces

también codifican regiones constantes o partes de los mismos. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes lo que conduce a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

5 Las células hospederas que albergan y expresan las cadenas del anticuerpo de unión a FXI y/o FXIa pueden ser procariotas o eucariotas. E. coli es un hospedero procariótico útil para clonación y expresión de los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospederos microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En
10 estos hospederos procariotas, también se pueden hacer los vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedera (*por ejemplo*, un origen de replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de la beta-lactamasa, o un sistema
15 promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción de ribosomas. Otros microbios, tales como levaduras, se pueden emplear también para expresar polipéptidos de unión a FXIa de la invención. Las células de insecto en combinación con vectores de baculovirus también se pueden utilizar.

20 En algunas realizaciones preferidas, las células hospederas de mamífero se usan para expresar y producir polipéptidos de unión a FXI y/o FXIa de la presente invención. Estos incluyen cualquier animal inmortal mortal o normal o anormal normal o célula humana. Por ejemplo, un número de líneas de células hospederas adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas se han desarrollado, incluyendo las líneas celulares CHO, diversas
25 líneas de células COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, y células B transformadas. El uso de cultivo de células de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se discute en general en, *por ejemplo*, Winnacker, de los genes a Clones, VCH Publishers, Nueva York, NY, 1987. Los vectores de expresión para células hospederas de mamífero pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador
30 (véase, *por ejemplo*, Queen, *et al.*, Immunol Rev. 89: 49-68, 1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción.

Estos vectores de expresión usualmente contienen promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos,

específicos del tipo de célula, la etapa específica, y/o modulable o regulable. Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la metalotioneína, el promotor tardío principal constitutivo de adenovirus, el promotor MMTV inducible con dexametasona, el promotor SV40, el promotor de MRP polIII, el promotor de MPSV constitutivo, el promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor humano temprano inmediato CMV), el promotor de CMV constitutivo, y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Los métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de hospedero celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación pueden utilizarse para otros hospederos celulares. (Véase en general Sambrook, *et al.*, Supra). Otros métodos incluyen, *por ejemplo*, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, mediada por liposomas transformación, la inyección y la microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policación: conjugados de ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión de la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, Cell 88: 223, 1997), la absorción de agente mejorada de ADN, y la transducción ex vivo. Para largo plazo, a menudo se desea la expresión estable de producción de alto rendimiento de proteínas recombinantes. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable las cadenas de anticuerpos de unión a FXIa o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas de forma estable se pueden proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

Marco o ingeniería Fc

Los anticuerpos manipulados de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los restos del marco dentro de VH y/o VL, *por ejemplo*, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente se realizan tales modificaciones marco para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos de marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sido objeto de mutación somática puede contener restos

de marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos se pueden identificar por comparación de las secuencias marco de anticuerpos a las secuencias de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas " a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio. Tales anticuerpos "retromutados " también están destinados a ser abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación marco implica la mutación de uno o más residuos de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epitopes de células T para reducir por ello la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20030153043 por Carr *et al.*

Además, o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, anticuerpos de la invención pueden ser diseñados para incluir modificaciones de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, la fijación del complemento, unión al receptor de Fc, y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (*por ejemplo*, uno o más restos químicos se pueden unir al anticuerpo) o ser modificados para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas formas de realización se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es del índice de Kabat de la UE.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, *por ejemplo*, aumentando o disminuyendo. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 5.677.425 por Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el montaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo está mutado para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácidos se introducen en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo ha deteriorado la proteína A Staphylococcal (SpA) de unión en relación con el dominio de unión a Fc-bisagra nativa SpA. Este enfoque se describe con más detalle en la patente US n° 6.165.745 de Ward *et al.*

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las mutaciones que se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 6.277.375 para Ward, se puede utilizar. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG de unión al receptor de rescate, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº. 5.869.046 y 6.121.022 por Presta *et al.*

En aún otras formas de realización, la región Fc se altera mediante la sustitución del residuo de aminoácido al menos un con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras de anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser sustituidos con un residuo aminoácido diferente, tal que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector, pero retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector a la que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter *et al.*

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos pueden ser sustituidos con un residuo aminoácido diferente, tal que el anticuerpo tenga alterada la unión a C1q y/o reducida o abolida citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos Nos. 6.194.551 por Idusogie *et al.*

En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos son alterados para modificar de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijarse el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*

En una realización específica, un anticuerpo anti-FXI/FXII descrito en este documento (*por ejemplo*, el anticuerpo comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) comprende una región Fc de IgG humana (*por ejemplo*, IgG1) que comprende dos sustituciones de aminoácidos, D265A y P329A, para reducir la probabilidad de ADCC o CDC causada por cualquier FXI asociada a la superficie. Estas sustituciones de alanina se han demostrado reducir la ADCC y CDC (ver, *por ejemplo*, Idusogie *et al.*, J. Immunol 164:4178 - 4184, 2000; Escudos *et al.*, J. Biol Chem 276:6.591 a 6.604, 2001).

En aún otra realización, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc gamma mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO

00/42072 por Presta. Por otra parte, los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγRI, RII, RIII y FcRn se han mapeado y variantes con unión mejorada se han descrito (véase Shields, RL *et al.*, 2001 J. Biol Chem 276: 6591 a 6604).

En aún otra realización, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado se puede hacer (es *decir*, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por "antígeno". Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos se pueden hacer, lo que resulta en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en el marco de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en dicho sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos Nos. 5.714.350 y 6.350.861 por Co *et al.*

Adicional o alternativamente, un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación puede ser hecho, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos fucosil o un anticuerpo que tenga mayores estructuras GlcNAc bisectriz. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedera con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células hospederas en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1176195 por Cuelgue *et al.* Describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, tal que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiban hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 describe por Presta una línea celular CHO variante, las células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a Asn (297) = Conectando hidratos de carbono, también resulta en la hipofucosilación de anticuerpos expresados en que la célula hospedera (véase también Shields, RL. *et al.*, 2002 J. Biol Chem 277: 26733 a 26740). La publicación PCT WO 99/54342 por Umana *et al.* Describe líneas celulares de ingeniería genética para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (*por ejemplo*, beta (1,4) -N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) tal que los anticuerpos expresados en las líneas celulares de ingeniería muestren una mayor estructura bisectriz GlcNAc que resulta en aumento

de la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana *et al.*, 1999 Nat Biotech 17. 176-180).

Métodos de manipulación de los anticuerpos alterados

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos de unión a FXIa que tienen secuencias de VH y VL o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa que se muestran en el presente documento se pueden usar para crear nuevos anticuerpos de unión a FXIa modificando la cadena pesada de longitud completa y/o secuencias de cadena ligera, las secuencias VH y/o VL, o la región constante unida al mismo. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de un anticuerpo de unión a FXIa de la invención se utilizan para crear anticuerpos de unión a FXIa estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a FXIa humano y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de FXIa (*por ejemplo*, que inhiben la unión FXIa al receptor de FXIa, inhibir la proliferación celular FXIa-dependiente).

Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos de la presente invención, o mutaciones de los mismos, se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco conocidas y / u otros CDRs para crear por ingeniería recombinante, anticuerpos adicionales de unión a FXIa de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de ingeniería es una o más de las secuencias de VL y/o VH proporcionada en este documento, o una o más regiones CDR de los mismos. Para crear el anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (*es decir*, expresa como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de VL y/o VH proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de los mismos. Más bien, la información contenida en la secuencia se utiliza como el material de partida para crear una secuencia de "segunda generación" derivada de la secuencia original (s) y luego la secuencia de "segunda generación" se prepara y se expresa como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a FXIa que consiste en una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3 y 23, una secuencia de CDR2 seleccionada de grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4 y 24, y/o una secuencia de CDR3 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 5 y 25; y una secuencia de región variable de anticuerpo de cadena ligera que tiene una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13 y 33, una secuencia de CDR2 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 14 y 34, y/o una secuencia de CDR3 seleccionado de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15 y 35;

para alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia del anticuerpo región variable de cadena pesada y/o la secuencia de región variable de anticuerpo de cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterado; y expresar la secuencia de anticuerpo alterado como una proteína.

5 Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a FXIa que consiste en una secuencia de región variable de anticuerpo de cadena pesada que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 6 y 26, una secuencia de CDR2 seleccionada de grupo que consiste en SEQ ID NOS: 7 y 27, y/o una secuencia de CDR3 seleccionado del grupo que consiste en
10 SEQ ID NOS: 8 y 28; y una secuencia de región variable de anticuerpo de cadena ligera que tiene una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 16 y 36, una secuencia de CDR2 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 17 y 37, y/o una secuencia de CDR3 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 18 y 38; para alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia del anticuerpo región
15 variable de cadena pesada y/o la secuencia de región variable de anticuerpo de cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterado; y expresar la secuencia de anticuerpo alterado como una proteína.

 Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo FXIa vinculante optimizado para la expresión en una célula de mamífero que
20 consiste en: una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NOS: 11 o 31 ; y una secuencia de anticuerpo de cadena ligera de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo de 21 o 41; altera al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de cadena pesada de anticuerpo de longitud completa y/o la secuencia del anticuerpo de cadena ligera de longitud
25 completa para crear al menos una secuencia anticuerpo alterado; y expresar la secuencia de anticuerpo alterado como una proteína. En una realización, la alteración de la cadena pesada o ligera está en la región marco de la cadena pesada o ligera.

 La secuencia de anticuerpo alterado puede prepararse también mediante el cribado de bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias de CDR3 fijas o determinantes de unión
30 esenciales mínimas como se describe en US2005 / 025552 y la diversidad en las secuencias de CDR1 y CDR2. El cribado se puede realizar de acuerdo con cualquier tecnología de detección adecuada para la detección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos, tales como la tecnología de presentación de fagos.

Técnicas de biología molecular estándar pueden ser utilizadas para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterado. El anticuerpo codificado por la secuencia de anticuerpo alterado es uno que conserva una, algunas o la totalidad de las propiedades funcionales de los anticuerpos de unión a FXIa descritos en este documento, que las propiedades funcionales incluyen, pero no se limita a, unirse específicamente a FXIa de humano, cynomolgus, rata y/o ratón; y el anticuerpo inhibe la proliferación celular dependiente de FXIa en un F36E y/o ensayo de proliferación celular Ba / F3-FXIaR.

En ciertas realizaciones de los métodos de anticuerpos de ingeniería de la invención, se pueden introducir mutaciones al azar o de forma selectiva a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia de codificación de anticuerpo de unión a FXIa y los anticuerpos de unión a FXIa modificados resultantes pueden ser examinados para la actividad de unión y / u otras propiedades funcionales como se describe aquí. Métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 describe por Short métodos para crear y cribar mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, ensamblaje de ligadura sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar *et al.* Describe métodos de uso de métodos de cribado de cálculo para optimizar las propiedades fisicoquímicas de anticuerpos.

En ciertas realizaciones los anticuerpos de la invención han sido diseñados para eliminar los sitios de desamidación. La desamidación se sabe que causa cambios estructurales y funcionales en un péptido o proteína. La deamidation puede dar lugar a la disminución de la bioactividad, así como alteraciones en la farmacocinética y la antigenicidad de la proteína farmacéutica. (*Anal Chem.* 2005 Mar 1; 77 (5): 1432-9).

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos han sido diseñados para aumentar el pI y mejorar sus propiedades similares a las drogas. El pI de una proteína es un factor determinante de las propiedades biofísicas globales de una molécula. Los anticuerpos que tienen pIs bajos han sido conocidos por ser menos solubles, menos estables, y con tendencia a la agregación. Además, la purificación de anticuerpos con baja pI es un reto y puede ser problemático, especialmente durante la ampliación para uso clínico. El aumento de la pI de los anticuerpos anti-FXI/FXIa, o Fab, de la invención han mejorado su solubilidad, lo que permite que los anticuerpos se puedan formular en concentraciones más altas (> 100 mg / ml). Formulación de los anticuerpos a altas concentraciones (*por ejemplo*, > 100 mg / ml) ofrece la ventaja de ser capaz de administrar dosis más altas de los anticuerpos, que a su vez puede permitir frecuencia de dosificación reducida, una ventaja significativa para el tratamiento de enfermedades crónicas, incluyendo la enfermedad trombótica y/o trastornos tromboembólicos.

Pls más altos también pueden aumentar el reciclaje mediado por FcRn de la versión IgG del anticuerpo lo que permite que el fármaco persista en el cuerpo durante una duración más larga, lo que requiere un menor número de inyecciones. Por último, la estabilidad general de los anticuerpos se mejora significativamente debido a una pl más alta que resulta en vida útil y bioactividad *in vivo* más larga. Preferiblemente, el pl es mayor que o igual a 8,2.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en este documento, tales como los expuestos en los ejemplos (*por ejemplo*, ELISA).

Usos profilácticos y terapéuticos

Anticuerpos que se unen FXI y/o FXIa como se describe en el presente documento (*por ejemplo*, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, tales como, los anticuerpos anti-FXI/FXIa que comprenden CDRs VL y VHCDRs de NOV1401), se pueden utilizar a una concentración terapéuticamente útil para el tratamiento de una enfermedad tromboembólica o trastorno (*por ejemplo*, accidente cerebrovascular trombótico, la fibrilación auricular, la prevención del ictus en la fibrilación auricular (SPAF), trombosis venosa profunda, tromboembolismo venoso, la embolia pulmonar, síndrome coronario agudo (SCA), accidente cerebrovascular isquémico, isquemia de las extremidades aguda, hipertensión crónica pulmonar tromboembólica, o embolia sistémica) mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención de unión. La presente invención proporciona un método de tratamiento de trastorno tromboembólico (*por ejemplo*, trastornos trombóticos) mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención. La presente invención proporciona un método para tratar trastornos tromboembólicos (*por ejemplo*, un accidente cerebrovascular trombótico, la fibrilación auricular, la prevención del ictus en la fibrilación auricular (SPAF), trombosis venosa profunda, tromboembolismo venoso, la embolia pulmonar, síndromes coronarios agudos (SCA), accidente cerebrovascular isquémico, isquemia extremidad aguda, hipertensión crónica tromboembólica pulmonar o embolia sistémica) mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos descritos en el presente documento (*por ejemplo*, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, tales como, NOV1401 o anticuerpos FXIa anti-FXI que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL) se pueden utilizar, *entre otras cosas*, para prevenir y mejorar las condiciones tromboembólicas o trastornos, incluyendo, pero no limitado a trastornos trombóticos, como se describe en mayor detalle en este documento.

Los anticuerpos proporcionados en este documento (*por ejemplo*, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, tales como, los anticuerpos anti-FXI/FXIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL) también se pueden utilizar en combinación con otros agentes para la prevención, tratamiento o mejora de los trastornos tromboembólicos. Por ejemplo, las terapias con estatinas se pueden usar en combinación con los anticuerpos de unión a FXIa y fragmentos de unión a antígeno de la invención para el tratamiento de pacientes con trombosis y/o trastornos tromboembólicos.

En una realización específica, en este documento se proporciona un método para tratar o prevenir el accidente cerebrovascular en un paciente con fibrilación auricular, que comprende administrar al paciente en necesidad del presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIa que se describe en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti- FXI / FXIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, se proporcionada en este documento un método de gestión o prevención de riesgos o condiciones asociadas con la fibrilación auricular (FA), tales como accidente cerebrovascular embólico y embolia sistémica, en un paciente con fibrilación auricular, que comprende administrar al paciente en necesidad del presente documento una eficaz cantidad de un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrita en este documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, se proporciona aquí un método para tratar, gestionar o prevenir afecciones asociadas con la fibrilación auricular (FA), tales como accidente cerebrovascular embólico y embolia sistémica, en un paciente con fibrilación auricular, que comprende administrar al paciente en necesidad del presente documento una eficaz cantidad de un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrita en este documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL. En realizaciones particulares, un paciente con FA tiene un alto riesgo de hemorragia.

En una realización específica, se proporciona aquí un método de tratamiento, gestión o prevención de la trombosis venosa profunda o condiciones asociados con los mismos, en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto con, o en riesgo de desarrollar, la trombosis venosa profunda), que comprende administrar al sujeto en necesidad presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-

FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, se proporciona aquí un método de tratamiento, gestión o prevención de la tromboembolia venosa (TEV) o condiciones asociadas con los mismos, en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto con, o en riesgo de desarrollar, tromboembolismo venoso), que comprende administrar al sujeto en necesidad del presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en este documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de VL NOV1401. En realizaciones particulares, los sujetos tratados con un anticuerpo anti-FXI/FXIIa proporcionada en este documento han experimentado 1) una primera TEV no provocada con bajo riesgo de hemorragia, 2) la recurrencia de TEV no provocada, o 3) TEV asociado con trombofilia incluyendo pacientes con cáncer.

En una realización específica, se proporciona aquí un método para tratar, gestionar o prevenir la embolia o condiciones pulmonar asociada con el mismo, en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto con, o en riesgo de desarrollar, embolia pulmonar), que comprende administrar al sujeto en necesidad presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en este documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, se proporciona aquí un método de tratamiento, gestión o prevención de síndromes coronarios agudos (SCA) o condiciones asociadas con el mismo, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en este documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, se proporciona aquí un método para tratar, gestionar o prevenir el accidente cerebrovascular isquémico, en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto con, o en riesgo de desarrollar, accidente cerebrovascular isquémico), que comprende la administración al sujeto en necesidad del presente documento una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, proporcionada en este documento es un método para tratar, gestionar o prevenir la isquemia del miembro aguda, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-

FXI/FXIIa descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, se proporciona aquí un método de tratamiento, gestión o prevención de la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una realización específica, se proporciona aquí un método para tratar, gestionar o prevenir la embolia sistémica, en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto con, o en riesgo de desarrollar, embolia sistémica), que comprende administrar al sujeto en necesidad del presente documento una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En una cierta realización, se proporciona aquí un método de tratamiento, la gestión, o la prevención de condiciones tromboembólicas que son las condiciones relacionadas con el catéter (*por ejemplo*, Hickman catéter en pacientes con cáncer) en la que los catéteres se convierten trombosada, u oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO), en la que el tubo se desarrolla coágulos, que comprende la administración al sujeto en necesidad del presente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL.

En realizaciones particulares, los sujetos en necesidad de tratamiento con un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en este documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anticuerpos anti-FXI/FXIIa que comprenden CDRs VL y VHCDRs de NOV1401, pueden incluir:

- Los sujetos con indicaciones para la terapia de anticoagulación crónica (*por ejemplo*, FA, trombo ventricular izquierdo, ictus cardioembólico previo)
- sujetos a intermedio a alto riesgo de hemorragia grave;
- los sujetos sometidos a una intervención electiva o primaria coronaria percutánea (ICP) con stent que se puede requerir para recibir la terapia antiplaquetaria dual (aspirina y antagonistas del receptor P2Y12) para prevenir la trombosis del stent.

En realizaciones particulares, una de las siguientes condiciones se puede tratar o manejar con un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en la Tabla 1, tal como, NOV1401 o anti-FXI/FXIa anticuerpos que comprenden CDRs y VHCDRs de NOV1401 VL:

- 5 • El tromboembolismo en pacientes con arritmia cardiaca presunta o confirmada como paroxística, la fibrilación auricular persistente o permanente o aleteo auricular;
- la prevención del ictus en la fibrilación auricular (SPAF), una subpoblación de pacientes con FA que son sometidos a intervenciones coronarias percutáneas (PCI);
- 10 • agudos eventos tromboembólicos venosos (VTE) de tratamiento y prevención de VTE secundaria prolongada en pacientes con alto riesgo de sangrado;
- eventos cerebrales y cardiovasculares en la prevención secundaria después de un ataque isquémico transitorio (AIT) o ictus no incapacitante y la prevención de eventos tromboembólicos en la insuficiencia cardíaca con ritmo sinusal;
- 15 • la formación de coágulos en la aurícula izquierda y el tromboembolismo en pacientes sometidos a cardioversión para la arritmia cardiaca;
- trombosis antes, durante y después del procedimiento de ablación de arritmias cardíacas;
- trombosis venosa, esto incluye, pero no exclusivamente, el tratamiento y la prevención secundaria de venas profundas o superficiales trombosis en los miembros
- 20 inferiores o miembro superior, la trombosis en las venas el abdominales y torácicas, trombosis del seno y trombosis de venas yugulares;
- trombosis en cualquier superficie artificial en las venas como catéteres o marcapasos cables;
- embolismo pulmonar en pacientes con o sin trombosis venosa;
- 25 • Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC);
- trombosis arterial en ruptura de la placa aterosclerótica, trombosis en prótesis intra-arterial o catéter y trombosis en las arterias de apariencia normal, esto incluye síndromes coronarios no exclusivamente agudos, infarto de miocardio con elevación del segmento ST, infarto de miocardio sin elevación del segmento ST, angina inestable,
- 30 trombosis de la endoprótesis, la trombosis de cualquier superficie artificial en el sistema arterial y trombosis de arterias pulmonares en sujetos con o sin hipertensión pulmonar;
- trombosis y tromboembolismo en pacientes sometidos a intervenciones coronarias percutáneas (ICP);

- derrames cardioembólicos y criptogénicos;
- trombosis en pacientes con neoplasias cancerosas invasivas y no invasivas;
- trombosis sobre un catéter permanente;
- trombosis y tromboembolismo en pacientes gravemente enfermos;
- 5 • trombosis cardíaca y tromboembolia, esto incluye, pero no exclusivamente trombosis cardíaca después de infarto de miocardio, trombosis cardíaca relacionada con condición tal como aneurisma cardíaco, la fibrosis miocárdica, la ampliación cardíaca y la insuficiencia, la miocarditis y la superficie artificial en el corazón;
- tromboembolismo en pacientes con enfermedad cardíaca valvular con o sin
- 10 fibrilación auricular;
- tromboembolismo mecánico o durante prótesis valvulares biológicas;
- lesiones o traumatismos en pacientes que tenían parches cardíacos nativos o artificiales, o tubos de conducción arteriales o venosos después de la reparación del corazón de malformaciones cardíacas simples o complejas;
- 15 • trombosis venosa y tromboembolismo después de la cirugía de reemplazo de rodilla, la cirugía de reemplazo de cadera y cirugía ortopédica, torácica o abdominal;
- trombosis arterial o venosa después de la neurocirugía incluyendo y las intervenciones de la médula espinal e intracraneales;
- congénita o trombofilia incluyendo pero no exclusivamente el Factor V de Leiden,
- 20 mutación de la protrombina, antitrombina III, proteína C y deficiencias de proteína S adquirida, mutación del factor XIII, disfibrinogenemia familiar, deficiencia congénita de plasminógeno, aumento de los niveles del Factor XI, anemia de células falciformes, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune, enfermedad intestinal crónica, síndrome nefrótico, uremia hemolítica, enfermedad mieloproliferativa, diseminada
- 25 coagulación intra vascular, hemoglobinuria paroxística nocturna y trombopenia inducida por heparina;
- trombosis y tromboembolismo en la enfermedad renal crónica; y
- trombosis y tromboembolismo en pacientes sometidos a hemodiálisis y la oxigenación por membrana extracorpórea.

30 En un aspecto específico, se proporcionan en este documento métodos de gestión de la hemorragia en un pacientes que está siendo tratados o administrados con un anticuerpo anti-FXI/FXIa proporcionado en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIa que comprende VL CDRs y VHCDRs de

NOV1401), por ejemplo, la hemorragia asociada con el trauma, cirugía o la menstruación después de la entrega, dicho método comprende la inversión del efecto anticoagulante. La deficiencia de FXI rara vez se asocia con manifestaciones hemorrágicas espontáneas; en aspectos específicos, el sangrado es más típicamente asociado con el trauma, cirugía, la menstruación o después de la entrega. Sangrado prolongado puede producir después de un trauma importante o después de la cirugía en órganos con alta área fibrinolítica, como el bucal, nasal, mucosa genital o urinario. La extracción del diente, la amigdalectomía y la ablación del útero o de próstata son ejemplos de intervenciones quirúrgicas que conllevan un alto riesgo de sangrado. Las personas con este trastorno también tienen una fuerte tendencia a desarrollar epistaxis y equimosis, y más raramente, sangre en la orina o los intestinos. La frecuencia de hemorragia muscular espontánea o intracraneal conjunta no se incrementa en pacientes con deficiencia de FXI. La punción venosa no se asocia generalmente con un sangrado prolongado. Otras mutaciones genéticas asociadas con la deficiencia de FXI pueden contribuir con la tendencia a la hemorragia heterogénea e imprevisible en los pacientes con deficiencia severa de FXI. El uso concomitante de antiagregantes, anticoagulantes y otros agentes fibrinolíticos puede aumentar el riesgo de sangrado.

En realizaciones particulares, se proporciona en este documento un método de gestión de la hemorragia en un paciente que está siendo tratado con un anticuerpo anti-FXI/FXIa proporcionada en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-FXI/FXIa que comprende VL CDRs y VHCDRs de NOV1401), dicho método comprende invertir temporalmente del efecto anticoagulante durante un tiempo suficiente para manejar la hemorragia. En realizaciones específicas, la etapa de inversión de las comprende efecto anticoagulante (i) reemplazo de fluido utilizando coloides, cristaloides, plasma humano o proteínas plasmáticas como la albúmina; o (ii) con la transfusión de glóbulos rojos envasados o sangre entera. En una realización particular, los agentes terapéuticos para la reversión del efecto de los anticoagulantes, *por ejemplo*, en casos de emergencia grave, incluyen, pero no se limitan a, prohemostasis componentes de la sangre tales como plasma fresco congelado (FFP), concentrados de complejo de protrombina (PCC) y activado PCC [(APCC); *por ejemplo*, el Factor VIII actividad de inhibidor bypass (FEIBA)] y el Factor VII recombinante (rFVIIa) activado. En una realización, un régimen comprende la administración de rFVIIa a una dosis de 30 g / kg seguido de la administración de rFVIIa a una dosis de 15-30 mg/kg cada 2-4 horas durante 24-48 horas, además de ácido tranexámico 1 g cada 6 horas durante 5 a 7 días pueden tener potencial para recuperar la hemostasia y detener el sangrado en los sujetos tratados con un anticuerpo anti-FXI/FXIa proporcionada en este documento (*por*

ejemplo, NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) que se someten a mayor cirugía y en pacientes con un sitio de sangrado no accesible activo. Por ejemplo, Riddell et al informaron de la experiencia en 4 pacientes con deficiencia severa de FXI sin inhibidor de someterse a la cirugía (Riddell et al., 2011, Haemost.; 106: 521-527); los
5 pacientes se les administró rFVIIa 30 mg/kg y ácido tranexámico 1 g por vía intravenosa en la inducción de la anestesia. Dosis en bolo posteriores de rFVIIa 15 a 30 g / kg se administraron a 2 a 4 intervalos de una hora como guiada por los resultados tromboelastometría de rotación (ROTEM). Los pacientes fueron tratados con rFVIIa en las dosis antes mencionadas durante 24-48 horas. 1 g de ácido tranexámico cada seis por horas se continuó durante cinco días. En
10 esta pequeña serie, rFVIIa en dosis tan bajas como 15-30 mg/kg en combinación con ácido tranexámico era segura y eficaz para corregir el defecto hemostático en la deficiencia severa de FXI en este estudio. En otro estudio que consta de 4 pacientes con deficiencia severa de FXI con inhibidor (anticuerpos neutralizantes autólogo FXI generalmente adquiridos después de la transfusión o administración de productos sanguíneos para los pacientes con deficiencia severa
15 de FXI) que experimentaron 5 cirugías, los autores (Livnat et al., 2009, Thromb. Haemost.; 102: 487-492) aplicaron el siguiente protocolo: 1 g de ácido tranexámico por vía oral dos horas antes de la cirugía, los pacientes recibieron inmediatamente antes de las intervenciones 1 g por vía intravenosa de ácido tranexámico FVIIa recombinante a dosis que van de 15 a 30 mg/kg se infundió en la terminación de la cirugía. Posteriormente, 1 g oral de ácido tranexámico se
20 administra cada 6 horas durante al menos 7 días. La cola de fibrina se pulverizó en el lecho de la vesícula biliar extirpada en un paciente. Este protocolo asegura la hemostasis normal en pacientes con deficiencia severa de FXI con inhibidor.

En un aspecto, la cola de fibrina se puede utilizar para restaurar la hemostasis local durante la cirugía dental en pacientes con deficiencia de FXI (Bolton-Maggs (2000) Hemofilia; 6
25 (S1): 100-9). En una cierta forma de realización con respecto a los métodos para administrar el sangrado en pacientes que están siendo tratados con un anticuerpo anti-FXI/FXIa proporcionado en este documento (*por ejemplo*, NOV1401), un régimen que consiste en 1 g de ácido tranexámico cada 6 horas durante 5 a 7 días asociado con el uso de pegamento de fibrina podría ser usado para establecer la hemostasia local en sujetos sometidos a cirugía menor y en
30 sujetos con sangrado sitio accesible, incluyendo eventos de hemorragia nasal y oral.

Composiciones Farmacéuticas

La invención proporciona composiciones Farmacéutica que comprenden los anticuerpos de unión a FXIa (fragmentos intactos o de unión) formulados junto con un vehículo Farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más

de otros agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir, por ejemplo, trastornos tromboembólicos (*por ejemplo*, trastornos trombóticos). Los vehículos Farmacéuticamente aceptables potencian o estabilizan la composición, o se pueden utilizar para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos Farmacéuticamente aceptables incluyen

5 disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y/o modo de administración varían

10 dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa (iv), intramuscular (im), intraperitoneal (ip), o subcutánea (sc), o proximal administrada al sitio de la diana. El vehículo Farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (*por ejemplo*, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, *es decir*,

15 anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede estar recubierta en un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

En aspectos particulares, los anticuerpos anti-FXI/FXIa descritos en este documento (*por ejemplo*, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, como NOV1401 o anticuerpos que

20 comprenden LCDRs y HCDRs de NOV1401) se formulan en aproximadamente 75 mg / 1 ml a aproximadamente 200 mg / 1 ml de concentración, en viales líquidos para inyecciones subcutáneas. En realizaciones particulares, la composición Farmacéutica comprende un vehículo o excipiente Farmacéutico, por ejemplo, sacarosa y polisorbato 20. En realizaciones particulares, la composición Farmacéutica comprende L-histidina y/o histidina HCl monohidrato.

25 En ciertas realizaciones, la composición Farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4-7, o 5-6.

En aspectos particulares, los anticuerpos anti-FXI/FXIa descritos en este documento (*por ejemplo*, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, como NOV1401 o anticuerpos que comprenden LCDRs y HCDRs de NOV1401) se formulan a 150 mg / 1 ml de concentración, en

30 viales de líquidos para inyecciones subcutáneas. En una realización, la formulación líquida 150 mg / ml contiene 150 mg de anticuerpo anti-FXI/FXIa, L-histidina, histidina HCl monohidrato, sacarosa y polisorbato 20, con un pH = $5,5 \pm 0,5$. La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión

y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. Absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones Farmacéutica de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos y practicados rutinariamente en el arte. Véase, *por ejemplo*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Las composiciones Farmacéuticas se Fabrican preferiblemente bajo condiciones GMP. Típicamente, una dosis terapéuticamente eficaz o dosis eficaz del anticuerpo de unión a FXIa se emplea en las composiciones Farmacéuticas de la invención. Los anticuerpos de unión a FXIa se formulan en formas de dosificación Farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (*por ejemplo*, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un único bolus puede ser administrado, varias dosis divididas se pueden administrar en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para Facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo Farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones Farmacéutica de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de Factor es Farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleado, del mismo, que se emplea la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular, la duración de el tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad,

sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y Factores similares.

Un médico puede empezar con dosis de los anticuerpos de la invención empleados en la composición Farmacéutica a niveles más bajos que la requerida para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En dosis generales, eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de un trastorno trombótico y/o tromboembólicos se describe en el presente documento y varían dependiendo de muchos Factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, otros medicamentos administrados y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis de tratamiento deben titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. Para la administración sistémica con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,01 a 15 mg/kg de peso corporal del hospedero. Para la administración (*por ejemplo*, la administración subcutánea) con un anticuerpo, la dosificación puede variar de 0,1 mg a 5 mg o de 1 mg a 600 mg. Por ejemplo, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en el presente documento se puede administrar a una dosis de 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,1 mg/kg, 2,2 mg/kg, 2,3 mg/kg, 2,4 mg/kg, 2,5 mg/kg, 2,6 mg/kg, 2,7 mg/kg, 2,8 mg/kg, 2,9 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,1 mg/kg, 3,2 mg/kg, 3,3 mg/kg, 3,4 mg/kg, 3,5 mg/kg, 3,6 mg/kg, 3,7 mg/kg, 3,8 mg/kg, 3,9 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,1 mg/kg, 4,2 mg/kg, 4,3 mg/kg, 4,4 mg/kg, 4,5 mg/kg, 4,6 mg/kg, 4,7 mg/kg, 4,8 mg/kg, 4,9 mg/kg, o 5,0 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración sistémica de una vez por cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración sistémica de una vez por semana, una vez por cada dos semanas, una vez por cada tres semanas, una vez al mes, o una vez cada 3 a 6 meses, o según sea necesario (PRN).

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo, IV o SC, en una dosis de 3 mg/kg.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo, IV o SC, en una dosis de 10 mg/kg.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo, IV o SC, en una dosis de 30 mg/kg.

5 En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo, IV o SC, en una dosis de 50 mg/kg.

10 En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo, IV o SC, en una dosis de 100 mg/kg.

15 En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía intravenosa o vía sc, a una dosis en el intervalo de 5 mg a 600 mg.

20 En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía intravenosa o vía sc, a una dosis de aproximadamente 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 90 mg, 100 mg, 120 mg, 150 mg, 180 mg, 200 mg, 210 mg, 240 mg, 250 mg, 270 mg, 300 mg, 330 mg, 350 mg, 360 mg, 390 mg, 400 mg, 420 mg, 450 mg, 480 mg, 500 mg, 510 mg, 540 mg, 550 mg, 570 mg o 600 mg.

25 En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía sc, a una dosis de 5 mg.

30 En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía sc, a una dosis de 15 mg.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende

las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía sc, a una dosis de 50 mg.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía sc, a una dosis de 150 mg.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía sc, a una dosis de 300 mg.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía sc, a una dosis de 600 mg.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía intravenosa o vía sc, a una dosis suficiente para alcanzar una duración media de la prolongación del TTPa de 2 veces o más durante un período de no más de 30 días, 35 días, 36 días, 37 días, 38 días, 39 días, 40 días, 41 días, 42 días, 43 días, 44 días, 45 días o 50 días.

En una cierta realización, un anticuerpo anti-FXI/FXIa descrito en este documento (*por ejemplo*, un anticuerpo descrito en la Tabla 1, como NOV1401 o un anticuerpo que comprende las CDR de VL y VH CDRs de NOV1401) se administra, por ejemplo por vía intravenosa o vía sc, a una dosis suficiente para alcanzar una duración media de la prolongación del TTPa de 2 veces o mayor para un no más de 42 días período.

Un anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanales, quincenales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de FXI- y/o anticuerpo de unión a FXIa en el paciente. Además intervalos de dosificación alternativas se pueden determinar por un médico y administrados mensual o como sea necesario para ser eficaz. En algunos métodos de administración sistémica, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 mg / ml o 1 a 1.200 g / ml, y en algunos métodos de 25-500 g / ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere menos administración frecuente.

Dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo y su diana en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados humana y muestran una semivida más larga, en los seres humanos, que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es
5 profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosis relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente elevada a intervalos relativamente cortos a veces se requiere hasta la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que
10 el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención pero no para limitar su alcance. Otras variantes de la invención serán fácilmente evidentes para un
15 experto normal en la técnica y están abarcados por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Panorámica de la Biblioteca de Fab de Fagos Humanos

Para la selección de anticuerpos que reconocen Factor XI humano, se utilizaron múltiples estrategias de paneo. Los anticuerpos terapéuticos contra diferentes variantes del
20 Factor XI humano y la proteína del dominio catalítico del Factor XIa de conejo se generaron mediante la selección de clones que se unen al Factor XI usando como fuente de anticuerpos una biblioteca de presentación de Fagos comercialmente disponibles, la biblioteca Morphosys HuCAL PLATINUM[®]. La biblioteca de fagémido se basa en el concepto HuCAL[®] (Knappik *et al.*, 2000, J Mol Biol 296: 57-86) y emplea la tecnología CysDisplay[™] para la visualización de
25 los Fab sobre la superficie del Fago (WO01/05950). Para el aislamiento de anticuerpos anti-XI Factor se emplearon estrategias de paneo en fase líquida.

Análisis de la reactividad cruzada

Fab purificados se ensayaron en ELISA para determinar la unión a las diferentes variantes del Factor XI humano (Factor XI, Factor XIa y dominio catalítico del Factor XIa) y las
30 proteínas biotiniladas del dominio catalítico del Factor XIa de conejo. Para este propósito se recubrieron placas de 384 pozos Maxisorp[™] (Nunc) con 10 ug / ml de NeutrAvidin en PBS durante la noche a 4 °C. Los antígenos fueron capturados en NeutrAvidin a través de la biotina a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos. La unión de los Fab a diferentes concentraciones se detectó por F(ab)₂ de cabra anti-IgG humana específica conjugado con

fosfatasa alcalina (diluido 1: 5000) usando sustrato Attophos fluorescente (Roche, catálogo # 11681982001). La emisión de fluorescencia a 535 nm se registró con excitación a 430 nm.

La conversión a IgG y Expresión IgG

Con el fin de expresar IgG de longitud completa en células T-PAC, se subclonaron
5 fragmentos de los dominios variables de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) a partir de
vectores de expresión de Fab en vectores pMorph®_hlg apropiados para IgG1 humana. Se
introdujeron dos sustituciones de aminoácidos (D265A y P329A) en la porción Fc para reducir la
probabilidad de ADCC o CDC causada por cualquier FXI asociada a la superficie. Estas
sustituciones de alanina han demostrado reducir la ADCC y CDC (ver, *por ejemplo*, Idosugie et
10 al., J. Immunol. 164:4178-4184, 2000; Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001). El
sobrenadante del cultivo celular se cosechó 7 días después de la transfección. Después de la
filtración estéril, la solución se sometió a cromatografía de afinidad con Proteína A utilizando
una estación de tratamiento de líquidos. Las muestras se eluyeron en un Citrato 50 nM, NaOH
140 nM y el pH se neutralizó con tampón Tris 1 M y se esterilizaron por filtración (tamaño de 0,2
15 micras de poro). Las concentraciones de proteína se determinaron por espectrofotometría UV a
280 nm y la pureza de las IgG se analizó bajo condiciones de desnaturalización y de reducción
en SDS-PAGE.

Ejemplo 2

Datos de unión

20 Análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR) para el dominio catalítico de FXI.

Las mediciones de SPR se realizaron en un biosensor óptico basado en resonancia de
plasmón de superficie BIACORE™ T200 (BIACORE™, GE Healthcare, Uppsala). Los chips de
sensores de la serie S (CM5), los kits de inmovilización y tampón de regeneración se
adquirieron de GE Healthcare (Uppsala). Se realizaron dos configuraciones de ensayo
25 diferentes según el formato de ligando, IgG o Fab. En primer lugar, la superficie se activó por N-
hidroxisuccinimida (NHS) y N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC). El
NOV1401-Fab se unió covalentemente a la matriz de dextrano activado en un chip CM5 por el
método estándar de acoplamiento de amina (GE Healthcare, Uppsala). Para la NOV1401-IgG
se realizó un ensayo de captura y se inmovilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc humano
30 (JIR) sobre el chip a 14.000 EF. Los grupos de superficie activa restantes se inactivaron con
etanolamina (EA). Se preparó una célula de referencia sin ligando inmovilizado y el sistema se
equilibró con tampón 1x HBS-EP+ (mM HEPES 10, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% P20, pH
7,4, Teknova H8022).

Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C a una velocidad de flujo de 50 μ l/min utilizando tampón HBS-EP+. Para el ensayo de captura, se capturó NOV1401-IgG hasta alcanzar un nivel de RU 80. Para los estudios cinéticos se utilizó una serie de diluciones del dominio catalítico FXI con concentraciones que varían desde 0 hasta 200 nM en tampón HBS-EP+. El tiempo de asociación fue de 120 s y el tiempo de disociación 180 s. La superficie se regeneró con una inyección única de glicina 10 mM de pH 1,5 (tiempo de contacto de 60 s, tiempo de estabilización 120 s). El procesamiento de datos, así como la determinación de k_{on} , k_{off} y K_D se realizaron con el software T200 BIAevaluation versión 1.0. Se aplicó referenciación doble (sustracción de referencia e inyección en blanco) para corregir los efectos a granel y otros artefactos sistemáticos. Los sensogramas se ajustaron mediante la aplicación de un modelo de unión 1:1 (R_{max} establecido en global).

La titulación de la solución de equilibrio (SET) para FXI y FXIa

Se prepararon 22 diluciones en serie 1,6N de los antígenos en tampón de muestra (PBS pH 7,4 que contiene 0,5% de BSA y 0,02% de Tween 20) y se añadió una concentración constante de los anticuerpos NOV1401-Fab (200 pM para huFXI y 500 pM para huFXIa) o NOV1401-(10 pM para huFXI y huFXIa) a cada concentración de antígeno. Las concentraciones de partida para la serie de dilución de antígeno fueron de 100 nM para huFXIa y 20 nM huFXI (ensayo Fab) o 1 (ensayo de IgG) nM. Se distribuyeron 60 μ l/pozo de cada mezcla de dilución por duplicado en un MTP de polipropileno de 384 pozos. El tampón de muestra sirvió como control negativo y una muestra que no contenía antígeno como control positivo (B_{max}). Se selló la placa y se incubó durante la noche a temperatura ambiente en un agitador. Una matriz estándar de 384 pozos MSD MTP se recubrió con 30 μ l/pozo de 0,1 μ g/ml huFXIa (para huFXIa y huFXI) diluido en PBS, se selló e incubó durante la noche a 4 °C.

Después de la incubación y el lavado tres veces con TBST (TBS que contenía 0,05% de Tween 20), la placa MSD recubierta con antígeno se bloqueó con 50 μ l/pozo de tampón de bloqueo (PBS que contiene 5% de BSA) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador. Se repitió la etapa de lavado y se transfirieron 30 μ l/pozo de la preparación de antígeno Fab/IgG de la MTP de polipropileno a la placa MSD recubierta con antígeno y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente en un agitador. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió a cada pozo 30 μ l de 0,5 μ g/ml de anticuerpo de detección anti-IgG/Fab de cabra marcado con ECL (MSD) diluido en tampón de muestra y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Después de lavar la placa nuevamente tres veces, se añadieron 35 μ l de tampón de lectura (MSD) a cada pozo. Se generaron las señales de

electroquimioluminiscencia (ECL) y se detectaron con el procesador de imágenes MSD Sector 6000.

Las señales promedio de ECL se calcularon a partir de mediciones duplicadas dentro de cada ensayo. Los datos se ajustaron a la línea de base restando el valor más bajo de todos los puntos de datos y se representaron gráficamente en función de la concentración del antígeno correspondiente. Los valores de K_D se determinaron mediante el ajuste de la gráfica con el siguiente modelo de ajuste 1:1 (para Fab) o 1:2 (para IgG) (de acuerdo con Piehler *et al.*, 1997).

Resultados

Los resultados se resumen en las **Tablas 3 y 4**. Para ambos formatos NOV1401, Fab e IgG, se obtuvieron valores de K_D de aproximadamente 20 nM para el dominio catalítico FXI como se determina por BIACORE™. Las afinidades hacia los Fab tanto para el FXI activado como para el zimógeno estaban en el rango de pM y fueron 66 y 300 veces más altas que la afinidad para el dominio catalítico, respectivamente. Sobre la base de sus altas afinidades, estas interacciones se midieron mediante ensayos SET. El NOV1401-Fab exhibió una afinidad cinco veces mayor al zimógeno de FXI (62 pM) que al FXI activado (305 pM). Las afinidades de la NOV1401-IgG tanto para el zimógeno dimérico como para el FXI activado se marcan como valores aparentes de K_D ya que la interacción podría estar influenciada por efectos de avidéz.

Para confirmar que NOV2401 también se une a FXI de mono cynomolgus, se realizaron experimentos SET con FXI de mono cynomolgus activado y zimógeno de FXI de mono cynomolgus que resulta en valores aparentes de K_D de $12,5 \pm 6.6$ pM (N=2) y $5,0 \pm 0.7$ pM (N=2), respectivamente. Por lo tanto, las afinidades de NOV1401 a las proteínas FXI de mono cynomolgus (forma activa y de zimógeno) son comparables a los de la unión a FXI humano (Tabla 3).

Tabla 2. Valores de K_D y parámetros cinéticos de unión de NOV1401-Fab/IgG para el dominio catalítico de FXI humano, determinado por BIACORE™.

Dominio catalítico	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	n
NOV1401-Fab	$3,2 \pm 0,5 \text{ E} + 4$	$6.1 \pm 1.8 \text{ E}-4$	19 ± 6	3
NOV1401-IgG	$4.2 \pm 1.6 \text{ E} + 4$	$8.8 \pm 2.2 \text{ E}-4$	21 ± 3	2

Tabla 3. Valores de K_D de NOV1401-Fab/IgG para FXI humano activado y zimógeno determinada por la titulación con solución de equilibrio (SET). *Sólo se reportaron valores aparentes de K_D ya que la interacción podría ser influenciada por efectos de avidéz.

NOV1401-Fab	K_D [pM]	n
-------------	------------	---

FXI humano activado	305 ± 8	3
Zimógeno de FXI humano	62 ± 18	3
NOV1401-IgG		
FXI humano activado	4,7 ± 2,1 *	3
zimógeno de FXI humano	1,3 ± 0,3 *	3

Referencia: Piehler *et al.* Evaluación de constantes de afinidad por la detección en Fase sólida rápida de la unión de equilibrio en un sistema de flujo, *J. Immunol. Meth.* 1997. 189-206

Ejemplo 3

5 **Ensayo bioquímico: La inhibición de la FXIa en ensayo de actividad usando péptido fluorescente como sustrato**

La actividad de FXIa humana (Kordia Life Science NL, número de catálogo HFXIa 1111A) se determina mediante el control de la escisión de un péptido marcado fluorescentemente con la secuencia de D-Leu-Pro-Arg * Rh110-D-Pro (número de producto BS-2494; Biosyntan GmbH, Berlín, Alemania). En la secuencia de sustrato escrito arriba, * indica el enlace escindible, D-Leu:D-leucina, Pro:prolina, Arg:arginina, Rh110:rodamina 110, D-Pro:D-prolina).la escisión mediada por FXIa del enlace escindible del sustrato peptídico conduce a un aumento de la intensidad de fluorescencia de la rodamina 110 cuando se utiliza longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 535 nm, respectivamente. La intensidad de fluorescencia se mide continuamente usando el lector de placas de microtitulación Safire2 (TECAN, Maennedorf, Suiza) a temperatura ambiente (RT). El tampón de ensayo contiene HEPES 50 mM a pH 7,4, NaCl 125 mM, CaCl₂ 5 mM y CHAPS al 0,05% (p/v). En el ensayo de actividad final, el FXIa humano y el sustrato BS-2494 tienen concentraciones de ensayo de 0,1 nM y 0,5 µM, respectivamente. En estas condiciones, el aumento de la intensidad de fluorescencia con el tiempo es lineal durante al menos 60 minutos.

Para el ensayo de la actividad inhibidora de los anticuerpos, se prepararon diluciones en serie de anticuerpos en tampón de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) que contiene 0,05% CHAPS (p/v). se incuban previamente dos µL de solución de anticuerpo con 10 µl de solución FXIa (en tampón de ensayo) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la etapa de pre-incubación, se añaden 10 µL de sustrato BS-2494 (diluido en tampón de ensayo), y se deja que la reacción enzimática continúe durante 60 minutos, después de lo cual se mide la intensidad de fluorescencia. Los valores de intensidad

de fluorescencia se convierten en porcentaje de inhibición mediante el uso de reacciones de control (la señal de reacciones no inhibidas es equivalente a 0% de inhibición, y una reacción que no contiene enzima es equivalente a 100% de inhibición) y la siguiente fórmula para la transferencia de valores:

5

$$y = 100\% - [FI(x) - FI(\min)] / [FI(\max) - FI(\min)],$$

donde y es el % de Inhibición a la concentración de anticuerpo x, FI (x) es la intensidad de fluorescencia medida a la concentración de anticuerpo x, FI (min) es la intensidad de fluorescencia medida en la reacción de control en ausencia de anticuerpo y FI (max) es la intensidad de fluorescencia medida en la reacción de control no inhibida. Los datos se analizaron mediante el programa Origin 7.5SR6 (Origin Corporation, USA). Los valores de IC₅₀ de los datos promediados se calculan utilizando la función logística:

15

$$y = A2 + (A1-A2) / (1 + (x / IC_{50})^p),$$

donde y es el % de Inhibición a la concentración de anticuerpo x, A1 es el valor más bajo de inhibición, y A2 el valor máximo de inhibición. El exponente, p, es el coeficiente de Hill.

20

La Figura 6A muestra una curva de respuesta compuesta representativa del anticuerpo NOV1401 que inhibe la actividad enzimática de FXIa humano de longitud completa. Los resultados muestran que NOV1401 inhibe la actividad enzimática del FXIa humano de longitud completa de una manera dependiente de la concentración (Figura 6A). El ajuste con el modelo de ajuste logístico conduce a un valor de IC₅₀ de aproximadamente 160 pM.

25

Ejemplo 4

Actividad anticoagulante de Abs anti-FXIa

La actividad antitrombótica de los anticuerpos NOV1401 y NOV1090 se ensayó usando el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) y el ensayo de generación de trombina (TGA).

30

Ensayo TTPa:

El plasma humano normal liofilizado “control de coagulación N” (referencia No 5020050) se adquirió de Technoclone GmbH (Viena, Austria). Se agruparon a partir de plasma citratado de donantes sanos seleccionados. El tiempo de coagulación obtenido con este plasma normal refleja las concentraciones normales de los factores de coagulación implicados en la

coagulación. El plasma liofilizado se almacenó a 4 °C. Antes de su uso, el plasma se resuspendió en 1 ml de agua destilada girando cuidadosamente el vial y luego manteniéndolo durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El reactivo desencadenante de la vía de activación intrínseca “aPTT-s” (referencia No TE0350) se adquirió de SYCOMed (Lemgo, Alemania) y contiene fosfolípidos y silicato (coloidal) en una solución tamponada (cloruro de sodio, polietilenglicol 20000; sacarosa, azida de sodio). La solución se almacenó a 4 ° C.

Se preparó Cloruro de calcio (referencia No C1016-500G; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) en agua bidestilada a una concentración stock de 25 mM.

El tampón UltraPure Tris/HCl a pH 7.5 (referencia No 15567-027, Life Technologies Corporation, Nueva York, USA) y la solución salina tamponada con fosfato (PBS, referencia No P4417-100TAB; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) fueron usados como diluyentes del compuesto.

3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidrato (CHAPS, referencia No C3023-25G) y dimetilsulfóxido anhidro (DMSO, referencia No 276855-100ML) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania).

Las mediciones del tiempo de coagulación se llevaron a cabo en un coagulómetro de bola Amelung modelo KC4A (comprado a través de SYCOMed, Lemgo, Alemania), que es un sistema de detección de coágulos mecánica semiautomatizado. El sistema utiliza una cubeta especial (referencia No AI4000; SYCOMed) en la que se colocó una bola de acero inoxidable (referencia No AI5000; SYCOMed).

La muestra se añade a la cubeta. Después de un período de incubación apropiado, la cubeta se coloca en el pozo de medición del coagulómetro de bola. El pozo de medición gira lentamente provocando que la cubeta gire a lo largo de su eje longitudinal. Debido a que la cubeta se coloca en un ángulo ligero, la gravedad y la inercia siempre colocan la bola en el punto más bajo de la cubeta. Exactamente opuesto a la posición de la bola hay un sensor magnético. Con la adición del reactivo de activación, se inicia un temporizador. A medida que tiene lugar la coagulación, se forman hebras de fibrina en la mezcla de reacción. Las hebras de fibrina alejan el balón de su posición de inercia que desencadena un impulso en el sensor magnético. Este impulso detiene electrónicamente el temporizador. El esquema de pipeteo fue el siguiente (**Tabla 4a**):

Tabla 4

Paso	del	Solución	ensayo de TTPA
------	-----	----------	----------------

ensayo	Volumen [μ l]	
	dilución de compuesto o	
1	diluyente	50
2	plasma de sangre humana	50
3	reactivo de TTPA-s	50
4	Incubar 3 minutos a 37 ° C bajo rotación	
5	25 mM de cloruro de calcio	50
6	Inmediatamente iniciar el temporizador	
	El temporizador se detiene cuando se	
7	forma el coágulo	

Las muestras se midieron por duplicado a una temperatura de 37 °C en el coagulómetro de balón Amelung.

La Figura 6B muestra una curva de respuesta compuesta representativa del anticuerpo NOV1401, dando lugar a la prolongación dependiente de la concentración de los tiempos de coagulación aPTT. Los resultados sugieren que NOV1401 conduce a la prolongación de los tiempos de coagulación de aPTT del plasma humano de una manera dependiente de la concentración. El tiempo de coagulación aPTT se duplica en comparación con el valor basal a una concentración de NOV1401 de aproximadamente 14 nM. El valor de IC₅₀ se calculó en aproximadamente 13 nM.

Ensayo de la generación de trombina (TGA):

Para el TGA se adquirió plasma humano normal liofilizado (control de coagulación N) de Technoclone GmbH, (número de referencia 5020040, Lot # 1P37B00) y se reconstituyó en agua destilada en un volumen sugerido por el fabricante.

La solución de sustrato se preparó usando el sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC de Technoclone GmbH (número de referencia 5006230, Lot # 8F41B00). Las alícuotas de sustrato liofilizado se mantuvieron a 4 °C. El sustrato se disolvió recientemente en el volumen de agua destilada indicado en el vial 20 minutos antes de su uso en el ensayo. La solución de sustrato reconstituido contiene el péptido fluorogénico a una concentración de 1 mM y CaCl₂ a una concentración de 15 mM.

Se adquirieron dos reactivos diferentes TGA 'RD' (referencia no 500622) y 'TGA RC bajo' (referencia No 5.006.213) para la activación de la vía intrínseca y extrínseca, respectivamente, de Technoclone GmbH (Viena, Austria). El reactivo desencadenante de

plasma pobre en plaquetas (PPP) 'bajo' fue adquirido de Thrombinoscope (TS31.00, Lote # PPL1409 / 01) y se reconstituyó en agua destilada como se indica en el vial. El reactivo PPP bajo contiene una mezcla de fosfolípidos y el Factor tisular en concentraciones muy bajas. El reactivo fue diluido 8 veces en Tris/HCl 80 mM a pH 7,4, 0,05% (p/v) de CHAPS inmediatamente antes del uso.

Las muestras se dividieron en alícuotas y se midieron en placas de 96 pozos de fondo negro/ claro comprados de Costar (producto No 3603). Para la automatización de transferencia, las muestras se colocaron en placas de 96 pozos de fondo en V (Costar, 3894) y se transfieren mediante un sistema de automatización CyBio (Analytik Jena Estados Unidos, Woburn, MA, USA).

El plasma sanguíneo humano reconstituido, el reactivo desencadenante "reactivo PPP bajo" y el sustrato se precalentaron durante 10 minutos en un baño de agua a 37 °C. Se prepararon diluciones enserie 1:3 en PBS en una placa de 96 pozos a partir de una concentración de 5 µM de NOV1401 (5x la concentración final más alta de 1 µM) para un total de 8 diluciones. Se mezclaron 222 µl de reactivo de activación con 1108 µl de solución de sustrato para generar la mezcla de sustrato reactivo activador 10 + 50. Se añadieron 80 µl por pozo en una placa de fondo en V de 96 pozos para su posterior transferencia usando un sistema de automatización. La placa se mantuvo a 37 °C. Los reactivos se añadieron de acuerdo con el esquema dado en la Tabla 4b.

Tabla 4b

paso del ensayo	Solución	Volumen [ul]
1	Las soluciones de anticuerpo (8 diluciones)	20
2	solución de reserva de plasma	20
	5 minutos de incubación a 37 ° C en un Thermomixer a 300 rpm.	
3	reactivo de activación mezcla / sustrato	10 + 50

Las mezclas de desencadenante/sustrato se transfirieron por medio de la automatización. Después de la adición de las mezclas, excitación y emisión a 360 nm a 460 nm, respectivamente, fueron registrados inmediatamente utilizando un instrumento Synergy Neo (BioTek Instrument Inc., Winooski, VT, USA). Las muestras se midieron por duplicado a una temperatura de 37 °C en el lector de placas durante 90 minutos a intervalos de 55 segundos.

Para generar valores máximos de concentración de trombina los datos fueron procesados utilizando el archivo de software de evaluación TGA proporcionado por Technoclone. Para generar gráficos para la concentración pico de trombina vs datos de concentración de anticuerpo, los datos se ajustaron usando el software GraphPad. Estos datos se ajustaron a un modelo de regresión no lineal en el software GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). El valor de IC_{50} se determinó usando la ecuación de la curva de dosis-respuesta integrada de de cuatro parámetros (pendiente variable): $y = inferior + (superior - inferior) / (1 + 10^{((LogIC50 - x) * ladera)})$ donde y es la concentración máxima de trombina formada en la concentración de inhibidor, x, y la parte superior e inferior representan la concentración de la trombina sin inhibidor y a la mayor concentración de inhibidor, respectivamente.

La Figura 6C muestra una curva de respuesta compuesta representativa del anticuerpo NOV1401, que muestra la inhibición dependiente de la concentración de la generación de trombina en la TGA. Se calculó un valor de IC_{50} de 24 nM y una concentración residual de trombina de 159 nM (línea punteada) para esta curva de respuesta compuesta

Ejemplo 5

La expresión de proteínas, formación de complejos, la cristalización y determinación de la estructura de NOV1401 (Fab) - FXI (dominio catalítico)

La estructura de la porción Fab del anticuerpo NOV1401, obtenido por escisión con papaína en el complejo con el dominio catalítico del Factor XI se obtuvo mediante cocrystalización con una resolución de 2.04Å.

Expresión de proteínas:

El constructo de expresión para el dominio catalítico FXI consistió en los residuos de aminoácidos 388 a 625 (Swissprot P03951) con la cisteína no apareado, C500, mutado a cisteína, con una extensión N-terminal compuesta de los aminoácidos MGSS (SEQ ID NO: 49), una etiqueta de octa-histidina (SEQ ID NO: 50), un sitio de escisión PreScission™ seguido de un sitio de escisión de enteroquinasa. El constructo fue montado por síntesis génica, se clonó en el vector de expresión pET24a y se expresó como cuerpos de inclusión en la cepa BL21 (DE3) de E. coli cultivadas en medio LB. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en Tris/HCl 50 mM pH 8,0, 6,0 M de cloruro de guanidinio, DTT 50 mM durante 2 hr., desnaturalizando completamente la proteína recombinante. Se añadió rápidamente un gran exceso de tampón de replegamiento (0,5 M de Tris pH 8,0, arginina HCl 0,9 mM, GSH 5 mM, GSSG 0,5 mM, 1 mM de EDTA a la solución de IB para dar una concentración final de proteína de 50 ug/ml y se incubó a

4 °C durante 5 días. El replegamiento y la formación del puente disulfuro se llevaron a cabo mediante diálisis con tampón A (50 mM de Tris pH 8,0) durante tres días.

La proteína replegada se cargó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico que contenía Q-Sepharose® FF (GE Healthcare) equilibrada y se lavó con tampón A.

5 La proteína recombinante no unida se recogió del flujo y las fracciones de lavado. El pH se ajustó a 7,4 mediante diálisis con Tris 50 mM pH 7,4 antes de la eliminación de la secuencia de etiqueta N-terminal usando enteroquinasa (enteroquinasa:proteína recombinante 1:100, 2,5 h de tiempo de incubación). La reacción de escisión se detuvo mediante la carga de la muestra en una columna de afinidad de benzamidina que contenía benzamidina Sepharose 4 FF, de alta
10 sub (GE Healthcare) equilibrada y se lavó con Tampón B (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M) y se eluyó con tampón C (tampón B que contiene benzamidina 50 mM). El dominio catalítico activo FXI se cargó en una columna de exclusión de tamaño XK 26/600 Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con acetato de sodio 20 mM pH 5,3, NaCl 75 mM. La concentración final de proteína fue de 1,07 mg/ml.

15 La porción Fab de NOV1401 se obtuvo mediante escisión con papaína de la IgG. La concentración final Fab fue 11 mg/ml en PBS. La digestión se realizó durante la noche a 37 °C usando papaína (Roche Diagnostics 108 014; 10 mg/ml) añadida al anticuerpo en una relación 1:100 (p/p) y en presencia de cisteína 1 mM (añadido a la solución original IgG). La digestión se detuvo mediante la adición de 50 µM del inhibidor específico de papaína E64, (N-[N-(L-3-trans-
20 carboxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina, y el digesto se pasó sobre una pequeña columna de proteína A (5 ml) con el fin de eliminar la parte Fc. El Fab se recuperó en el flujo, se dializó contra PBS, se concentró hasta su concentración final por ultrafiltración y se filtró estéril (0,22 m).

La formación del complejo, la cristalización y resolución de la estructura:

25 El dominio catalítico FXI y el Fab se mezclaron en una relación equimolar y se concentraron hasta una concentración final de ca. 9 mg/ml.

El cristal utilizado para la recogida de datos se obtuvo a 277K que emplea difusión de vapor de gota sentada mezclando 0,3 µL de solución de reserva (cloruro de amonio 0,2 M , PEG 3350 al 20%), 0,2 µL de complejo Fab-FXI y 0,1 µL de semillas de cristal de cristales
30 obtenidos en una primera ronda de selección de cristal.

Para la recolección de datos, los cristales se congelaron directamente en nitrógeno líquido. Los datos fueron recolectados en la línea de luz de la fuente de luz suiza X10SA a una longitud de onda de 1,00002 Å usando un detector de píxeles Pilatus (Dectris) a 100K. El tratamiento y escalado de la información se realizó con XDS y XSCALE (Kabsch, W. (2010)

Acta Cryst. D66, 125-132). El cristal difractó a una resolución de 2,04 Å con dimensiones de la celda unidad de $a = 191,27$, $b = 53,22$, $c = 65,164$ $\alpha = 90,0$, $\beta = 94,56$, $\gamma = 90,0$ (grupo espacial C2) con una copia del complejo por unidad asimétrica.

La estructura del complejo se resolvió por reemplazo molecular usando estructuras del dominio catalítico FXI y un Fab truncado previamente resuelto internamente como modelos de búsqueda utilizando PHASER (McCoy, AJ *et al.* (2007) J. Appl. Cryst. 40, 658 -674). Se realizaron ciclos alternos de refinamiento y reconstrucción utilizando Buster y coot *rsp.* (Bricogne, G. *et al.* (2010) BUSTER versión 2.9 Cambridge, Reino Unido: Global Phasing Ltd.; Emsley, P. y Cowtan, K. (2004) Acta Crystallogr D60, 2126-2132). La recopilación de datos y las estadísticas de refinamiento se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento

Recopilación de datos	
grupo espacial	C2
medidas de la célula	
a, b, c (Å)	191.27, 53.22, 65.16
α, β, γ (°)	90, 94,56, 90
Resolución (Å)	64,96 a 2,04 (2/9 a 2/4)
R_{sym}	0,099 (0,571)
$I / \sigma I$	10,8 (2,7)
Exhaustividad (%)	95,9 (98,4)
Redundancia	3.2
Refinamiento	
Resolución (Å)	64.96 - 2.03
No. reflexiones	40088
$R_{\text{trabajo}} / R_{\text{libre}}$	0,217 / 0,282
No. átomos	
Proteína	5071
Agua	413
Desviaciones rms	

Longitudes de enlace (Å)	0.01
Ángulos de enlace (°)	1.19

* Los valores entre paréntesis corresponden a la capa de más alta resolución.

Descripción de la estructura:

La estructura revela que el epítipo de unión del anticuerpo NOV1401 se une a la superficie del sitio activo con el bucle CDR3 de la cadena pesada que cubre porciones de los subsitios S3, S2, S1-beta y S1'. Los bucles adyacentes CDR1 y CDR2 de la cadena pesada inducen cambios conformacionales en los bucles FXI 145 y 220 (numeración de la quimotripsina). Además, cuatro residuos FXI N-terminales, así como residuos que rodean a Asp189 se desordenan; ambos son partes con funciones clave para la actividad catalítica de FXI. El cambio conformacional del bucle 145 conduce a la oclusión de la bolsa S1 por Arg144 y de subsitio S2' por Tyr143. Por lo tanto, la unión de anticuerpos conduce a una conformación inhibida de FXI a través de múltiples mecanismos.

La forma inhibida observada comparte rasgos descritos para la forma de zimógeno de longitud completa de FXI (PDB 2F83). Las porciones del dominio catalítico FXI que han cambiado conformación o se han desordenado como consecuencia de la unión del anticuerpo también están desordenados en el zimógeno. Esto explica la fuerte unión de NOV1401 también a la forma zimógeno de FXI.

Nuestro hallazgo de que NOV1401 no inhibe la activación del zimógeno FXI está de acuerdo con la distancia del epítipo de unión del sitio de escisión de activación de zimógeno FXIa. NOV1401 se une tanto a FXI como a FXIa. La estructura de rayos X del complejo Fab-FXI CD revela un modo de enlace único y mecanismo de inhibición de FXIa. NOV1401 se une al sitio activo de FXIa (**Figura 4**) e induce cambios conformacionales de los cuatro residuos N-terminales y bucles de dominio catalítico que conducen a una conformación inactiva. Esta conformación inactiva comparte características con la estructura del dominio catalítico inactivo en el zimógeno (**Figura 5**) proporcionando una explicación de cómo tanto FXI como FXIa se pueden unir con alta afinidad por NOV1401. Por ejemplo, tres bucles de sitio catalítico (*por ejemplo*, el bucle 220, el bucle 188, y el bucle 145), que están desordenados en la estructura del zimógeno también están desordenados o desplazados en la estructura compleja NOV1401 Fab-FXI CD, y un puente de sal N-terminal observado en la confirmación activa está ausente tanto en el zimógeno y en estructuras complejas NOV1401 Fab-FXI CD (Tabla 6). Por lo tanto,

NOV1401 parece inducir cambios conformacionales dentro del CD que conducen a una conformación inactiva, similares al zimógeno.

Tabla 6: Características estructurales de FXIa CD, CD FXIa

Complejado con NOV1401 y FXI-zimógeno (CD):

	FXIa CD	complejo NOV1401 CD -FXI	zimógeno FXI
Puente salino Ile16-Asp194	+	-	-
Bucle 145	ordenado	desplazada	desordenado
Bucle 188	ordenado	desordenado	desordenado
Bucle 220	ordenado	desplazada	desordenado

Ejemplo 6

Estructura de rayos X basada en el mapeo de epítomos

Residuos de FXI en contacto con el Fab se analizaron mediante AREAIMOL (Briggs, PJ (2000) CCP4 Boletín No. 38), determinando la diferencia del área superficial del residuo cuando se calcula sin unión a Fab y en el complejo con Fab, que se describe como sigue en la Tabla 7 y la Tabla 8a (numeración Swissprot):

Tabla 7: epítopo FXI

Epítopo (Subrayado: contactos de cadena ligera y de cadena pesada):

Contactos de cadena ligera	Contactos de cadena pesada
Pro410	Leu 415
Arg413	Cys4 16
<u>His431</u>	<u>His431</u>
<u>Tyr434</u>	Cys 432
Gly435	<u>Tyr434</u>
Glu437	<u>Tyr472</u>
<u>Tyr472</u>	<u>Met474</u>
Lys473	

<u>Met474</u>	Ala475
<u>Glu476</u>	<u>Glu476</u>
<u>Tyr521</u>	<u>Tyr521</u>
<u>Leu524</u>	Arg522
<u>Arg525</u>	Lys523
<u>Asp526</u>	<u>Leu524</u>
His552	<u>Arg525</u>
	<u>Asp526</u>
	Lys527
	Arg548
	Ser575
	Ser594
	Trp595
	Gly596
	Glu597
	Arg602
	Glu603
	Arg604

El epítipo FXI está formado por los siguientes restos:

Pro410, Arg413, Leu415, Cys416, His431, Cys432, Tyr434, Gly435, Glu437, Tyr472-Glu476, Tyr521-Lys527, Arg548, His552, Ser575, Ser594-Glu597, Arg602-Arg604.

Tabla 8a: Residuos de FXI en contacto con NOV1401 (epítipos)

Residuos	Diferencia de área
PRO A 410	-11.0
ARG A 413	-36.3
LEU A 415	-3.6
CYS A 416	-2.1
HIS A 431	-36.5
CYS A 432	-0.6
TYR A 434	-108,1
GLY A 435	-31.6
GLU A 437	-3,7
TYR A 472	-13.0

LYS A 473	-40.1
MET A 474	-73.1
ALA A 475	-12.0
GLU A 476	-40.4
TYR A 521	-18.5
ARG A 522	-46.6
LYS A 523	-74.7
LEU A 524	-147,1
ARG A 525	-212,6
ASP A 526	-17.7
LYS A 527	-0.2
ARG A 548	-11.6
HIS A 552	-4,0
SER A 575	-7.7
SER A 594	-8.7
TRP A 595	-20.9
GLY A 596	-17.5
GLU A 597	-49.0
ARG 602 A	-18.5
GLU A 603	-2.0
ARG 604 A	-41.0

epítopo de rayos X mapeado en la secuencia del dominio catalítico (residuos que forman el epítopo en negrita y subrayados):

388 391
 IVG GTASVRGEWP WQVTLHTTS**P** TQ**RHLC**GGSI IGNQWILTAA **HCFYGV**ESPK
 441
 ILRVYSGILN QSEIKEDTSF FGVQEIIHHD **QYKMAE**SGYD IALLKLETTV
 491
 NYTDSQRPIC LPSKGDRNVI YTDCWVTGWG **YRKLRDK**IQN TLQKAKIPLV
 541
 TNEECQK**R**YR G**H**KITHKMIC AGYREGGKDA CKGD**S**GGPLS CKHNEVWHLV
 591 625
 GIT**SWGE**GCA Q**RER**PGVYTN VVEYVDWILE KTQAV (SEQ ID NO: 51)

5

La tabla 8b muestra los restos del anticuerpo en contacto con FXI (paratopo).

Tabla 8b: Residuos de NOV1401 en contacto con FXI (paratopo).

L, cadena ligera; H, cadena pesada

Diferencia de	Area
---------------	------

residuo	
SER L 27	-1.80
GLY L 30	-5.00
SER L 31	-52.60
ASN L 32	-21.00
ASP L 33	-22.00
TYR L 50	-36.00
LYS L 51	-54.20
TYR L 53	-41.40
ASN L 54	-25.50
LYS L 67	-6.90
PRT L 92	-44.30
GLN L 94	-72.00
ARG L 95	-5.70
PHE L 97	-54.70
ASP L 98	-2.70
VAL L 99	-0.10
PHE H 27	-2.00
THR H 28	-20.50
SER H 30	-13.80
THR H 31	-78.90
ALA H 33	-10.80
PRT H 47	-12.70
SER H 52	-2.20
TYR H 59	-62.00
TYR H 60	-0.80
GLU H 99	-1.70
SER H 101	-51.30
TYR H 102	-116,60
LEU H 103	-175,00
TYR H 104	-140,20
SER H 105	-1.30

Ejemplo 7

Efecto del anticuerpo FXI sobre la trombosis inducida por FeCl₃ en ratones

Los ratones deficientes en FXI (ratones FXI -/-) en un fondo C57Bl fueron criados en
5 Novartis (E. Hanover, NJ) y se utilizaron para evaluar la eficacia antitrombótica de NOV1401. Una vez reconstituido por vía intravenosa con FXI humano (hFXI), estos ratones adquieren un fenotipo trombofílico de tipo salvaje cuando se exponen a un estímulo trombogénico. En los

estudios de la presente memoria, la trombosis fue inducida en la arteria carótida aplicando cloruro férrico (FeCl_3) a la superficie de la arteria.

NOV1401 se inyectó como un bolo a través de la vena yugular de ratones anestesiados 15 minutos antes de la inducción de la trombosis. Las dosis de anticuerpo oscilaron entre 0,24 mg/kg - 0,47 mg/kg. Los ratones FXI -/- se reconstituyeron con FXI humano mediante la inyección de 0,47 mg/kg de FXI humano a través de la vena yugular 10 minutos antes de la inducción con FeCl_3 . Luego se aplicaron dos piezas de papel filtro de 1 mm x 1,5 mm saturado con FeCl_3 al 3,5% en los lados opuestos de la arteria carótida en contacto con su superficie adventicia, y se retiraron 3 minutos después, seguido de un lavado a fondo con solución salina. El flujo de sangre a través de la arteria carótida se midió con una sonda de flujo transónico. Se obtuvo el flujo de sangre basal durante 5 minutos antes de la aplicación de FeCl_3 y luego durante 30 minutos después de la aplicación de FeCl_3 (*es decir*, durante el período de trombogénico). Al final del experimento, se tomó una muestra de sangre de la vena cava en jeringas que contenían citrato de sodio al 3,8%, se preparó plasma y se sometió a un ensayo de aPTT.

La Figura 1A muestra el efecto de NOV1401 sobre la trombosis inducida por FeCl_3 en ratones FXI-/- reconstituidos con FXI humano (modelo de ratón FXI humanizado). **La Figura 1B**. Muestra el efecto de NOV1401 sobre aPTT en el mismo modelo de ratón. **La Figura 1C** muestra la prolongación del aPTT en ratones FXI-/- en comparación con ratones de tipo salvaje.

NOV1401 inhibió totalmente la formación de trombos inducida por FeCl_3 en ratones FXI-/- reconstituidos con hFXI (**Figura 1A**) a partir de 0,24 mg/kg. Se observó una fuerte respuesta dependiente de la dosis, que probablemente refleja una respuesta antitrombótica estequiométrica de todo o nada. El aPTT se prolongó hasta 1,6 veces por encima de los controles del vehículo en el grupo de dosis alta (**Figura 1B**), correspondiente a un mismo nivel de prolongación por el agotamiento genético de FXI (**Figura 1C**), *es decir*, el efecto máximo. Estos resultados muestran que NOV1401 tiene actividad antitrombótica en el modelo de trombosis por FeCl_3 en ratón.

Ejemplo 8

Efectos del anticuerpo FXI en FXI libre y TTPA en monos cynomolgus

Para evaluar el perfil farmacocinético (PK) y los efectos farmacológicos de un anticuerpo anti-FXI/FXIa, como NOV1401, el anticuerpo se administró por inyecciones vía subcutánea (sc) o intravenosa (IV) a monos cynomolgus en un estudio de dosis creciente.

El efecto anticoagulante de NOV1401 se caracterizó en monos cynomolgus probando la capacidad del anticuerpo para prolongar el aPTT y reducir los niveles de FXI (FXIf) libre después de una sola dosis vía intravenosa (N = 2) o subcutánea (N = 2) de 3 mg/kg. Se administró una segunda dosis de 10 mg/kg a todos los animales, seguido de una tercera dosis de 30 mg/kg para determinar si los efectos observados en 3 mg/kg pueden ser potenciados por dosis más altas. Estos resultados muestran que NOV1401 ha sostenido la actividad anticoagulante en monos cynomolgus. La farmacodinámica (PD) de NOV1401, caracterizado por su efecto anticoagulante según lo determinado por los niveles de aPTT y FXIf, fueron comparados con el perfil PK. La comparación indica que existe una buena correlación PK/PD.

Se dosificaron los animales ya sea IV (N = 2) o SC (N = 2) con NOV1401 en el día 1 del estudio a 3 mg/kg, el día 85 a 10 mg/kg y el día 114 a 30 mg/kg. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de coagulación con citrato de sodio a los 15 minutos y 2 horas después de la dosis para los animales dosificados vía IV, y para todos los animales en la prueba previa, 6, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosis (días 1, 85 y 114) y a las 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50, 53, 57, 60, 64, 66, 71, 75 y 78 días después de la dosis (solo el día 1 también se recogió la sangre en los días 92, 95, 99, 102, 107, 110, 121, 124, 128 y antes de la dosificación en el día 114. Todas las muestras de sangre se centrifugaron; se obtuvieron muestras de plasma y se congelaron a aproximadamente -70 °C o por debajo.

Las concentraciones plasmáticas totales de NOV1401 se midieron por métodos estándar para la detección de IgG humana por ELISA usando un inmunoensayo de tipo sándwich con un anticuerpo monoclonal anti-IgG humano de ratón como anticuerpo de captura y un anticuerpo de cabra anti-IgG humana con una etiqueta HRP como anticuerpo de detección.

Para las mediciones de FXI libres en muestras de plasma que contienen tanto FXI como NOV1401, se capturó FXI no unido con NOV1401 inmovilizado y se eliminó por lavado FXI ya complejo con NOV1401. A continuación, el FXI unido a la placa se detectó con un anticuerpo 14E11 que contenía Fc de ratón, un anticuerpo monoclonal que se une al dominio A2 de FXI y ha sido descrito en la literatura (Cheng, *et al.* Blood, 116: 3981 hasta 3989, 2010). La afinidad muy alta de NOV1401 tanto con FXI y FXIa y los diferentes sitios de unión para NOV1401 y el anticuerpo de detección 14E11 permitieron una determinación precisa de FXI libre.

Las placas de ELISA (384 pozos LumiTrac™ 600 HB) se recubrieron con NOV1401 (5 µg/ml en PBS) para la unión de FXI libre. Después del bloqueo (bloqueador de leche: KPL # 50-82-01, 1:20 dilución) y lavado de las placas con tampón de lavado (PBS; 0,05% de Tween 20), las muestras de plasma se diluyeron 1:40 en tampón de ensayo (HEPES 50 mM a pH 7,4, NaCl 125 mM, 5 mM CaCl₂, EDTA 5 mM y 0,05% (p/v) de CHAPS) se incubaron a temperatura

ambiente durante 30 min. y se lavó 3 veces con tampón de lavado. El anticuerpo de detección 14E11 se añadió a 1 µg/ml en tampón de dilución (1,7 mM de fosfato monobásico de sodio, 8,1 mM de fosfato de sodio dibásico heptahidratado, cloruro de sodio 0,15 M, 0,7% de Triton X-100, y azida de sodio al 0,1%, pH 7) que contenía 0,7% de caseína. Después de lavar las placas con
5 tampón de lavado, se añadió un anticuerpo de detección secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Sigma # A5278) a 0,5 µg/ml en tampón de dilución que contenía 0,4% de caseína. Después de lavar las placas en tampón de lavado, se agregaron 50 µL de solución de sustrato quimioluminiscente de peroxidasa (LumiGLO, KPL # 54-61-01) y la señal de luminiscencia se leyó inmediatamente en un lector de microplacas multi-modo (Spectramax
10 M5E). La concentración de FXI libre en cada muestra se determinó utilizando una curva estándar generada con FXI humano (zimógeno) de Enzyme Research Laboratories (Catálogo #HFXI 1111) a partir de FXI 100 nM con un factor de dilución de 2 y 22 etapas de dilución. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue 0,24 nM FXI teniendo en cuenta la dilución 1:40 antes de la medición.

15 Las muestras de plasma de todos los puntos de tiempo se sometieron a análisis de aPTT y los resultados se compararon con la concentración total de NOV1401 en plasma y los niveles de FXI libre. **Las Figuras 2A y 2B** muestran los cambios de los tiempos de coagulación de aPTT en relación con los niveles totales de NOV1401 en plasma para animales dosificados IV y SC. **Las Figuras 3A y 3B** muestran los cambios de los tiempos de coagulación de aPTT en
20 relación con los niveles de FXI libre para animales dosificados IV y SC.

Para NOV1401 administrado por vía IV, se observaron los niveles de NOV1401 totales en plasma más altos a los 15 min después de la dosis (**Figura 2A**). En este momento el aPTT fue aproximadamente el doble respecto al valor basal en los animales y se mantuvo a este nivel durante un promedio de 5-6 semanas. Las prolongaciones medias aPTT de 15 min después de
25 la dosis sobre las mediciones anteriores a la caída hacia la línea de base fueron de $2,0 \pm 0,02$ veces y $1,9 \pm 0,03$ veces para cada animal.

Hacia el día 85, antes de la administración de una segunda dosis, el aPTT había alcanzado los niveles de referencia y las concentraciones plasmáticas de NOV1401 habían caído por debajo de 10 nM. Se administró una segunda dosis de 10 mg/kg en el día 85
30 aumentando la concentración plasmática de NOV1401 total en al menos 3 veces y que resulta en la prolongación del aPTT similar a lo que se observó después de la primera dosis. Se administró una tercera dosis de 30 mg/kg en el día 114, mientras aún estaba el aPTT prolongado, y no dio lugar a ninguna prolongación significativa de aPTT adicional, a pesar de otro incremento de al menos 3 veces en la concentración plasmática total de NOV1401 (**Figura**

2A). Por lo tanto, las dosis de NOV1401 mayores a 3 mg/kg lograron la prolongación del aPTT comparable a la dosis de 3 mg/kg, y no pareció aumentar la magnitud de la prolongación del aPTT. Como era de esperarse, la administración SC de NOV1401 resultó en un aumento más lento en aPTT que con la administración IV, pero el grado de prolongación era comparable a la del grupo IV (**Figura 2B**). El aPTT se prolongó en comparación con la línea base durante un promedio de 5-6 semanas en los dos animales. Las prolongaciones medias via SC aPTT fueron similares a las de los animales tratados con IV: $2,0 \pm 0,03$ y $1,8 \pm 0,02$ a partir de 6 hrs después de la dosis, a través de las medidas que preceden la disminución hacia la línea de base. Al igual que en la IV, la administración de dosis más altas no dio lugar a respuestas de aPTT mayores a pesar de exposiciones al plasma NOV1401 superiores.

Los resultados en las Figuras 2A-2B demuestran que NOV1401 prolonga aPTT en monos cynomolgus.

La concentración plasmática media de FXIf fue de $10,9 \pm 0,3$ nM en el grupo IV y cayó rápidamente (por 15 min.) tras la inyección de NOV1401 (**Figura 3A**). Los niveles de FXIf en plasma se mantuvieron bajos hasta que los niveles plasmáticos totales de NOV1401 bajaron a entre 15 nM-25 nM (**Figura 2A, Figura 3A**). En el grupo SC, la concentración media de FXIf basal fue de $14,3 \pm 1,0$ nM. FXIf era mucho menor frente a la línea basal en 6 horas después del tratamiento (**Figura 3B**), y se mantuvo baja hasta que los niveles en plasma de NOV1401 disminuyeron a entre 15 nM-25 nM (**Figura 2B, Figura 3B**). El FXIf volvió a caer drásticamente después de la segunda dosis a 10 mg/kg en todos los animales y se mantuvo baja hasta el final del estudio. Las dos dosis más altas no redujeron aún más FXIf respecto al valor basal.

En todos los animales tratados, la caída y la recuperación de los niveles de FXIf se relacionaron temporal e inversamente con la prolongación de aPTT inducida por NOV1401, confirmando que NOV1401 inhibe la función de la vía de coagulación intrínseca (prolonga aPTT) mediante la reducción de FXIf

Estos resultados (*por ejemplo*, las Figuras 3A y 3B) demuestran que NOV1401 reduce los niveles de FXIf en plasma en monos cynomolgus. En los estudios con monos cynomolgus, no se observó evidencia de hemorragia excesiva en los sitios de punción venosa o por las observaciones macroscópicas de la necropsia. Por otra parte, no se detectó sangre oculta en las heces a lo largo del estudio.

También se observó un efecto anticoagulante sostenido de NOV1401 en un estudio de toxicidad de dosis repetida de 13 semanas SC/4 semanas IV en monos cynomolgus. En este estudio, NOV1401 se administró semanalmente en dosis de 10 mg/kg (N = 3, macho y hembra combinados) y 100 mg/kg (N = 5, macho y hembra combinados) vía SC durante 13 semanas

(14 dosis) o en 50 mg/kg (N = 3, macho y hembra combinados) vía IV durante 4 semanas (5 dosis). El grupo de control (N = 5, macho y hembra combinados) recibió vehículo durante 13 semanas y 4 vía SC e IV, respectivamente. FXI:C se evaluó midiendo el tiempo de coagulación de muestras de plasma de mono cynomolgus en presencia de plasma humano deficiente en FXI (aPTT de una etapa). aPTT y FXI:C se midieron en los días de estudio 2, 23 y 79 para los grupos SC y en los días 2 y 23 para el grupo IV. En todos los animales y todos los grupos de tratamiento, se observó una prolongación del aPTT de 2.1 a 3 veces (**Figura 7A**). El efecto se mantuvo durante toda la fase de dosificación del estudio y no se observó una dependencia de la dosis similar a la observación en el estudio de dosis creciente anterior. FXI:C se redujo en todos los animales y los grupos de tratamiento en 88 a 95% y se mantuvo en estos niveles a lo largo de la fase de dosificación del estudio (**Figura 7B**). El efecto en FXI:C también fue independiente de la dosis sobre estas dosis.

No se observó ninguna evidencia de indicios macroscópicos o microscópicos de sangrado, incluyendo sangrado excesivo en los sitios de punción venosa (incluyendo los sitios de inyección subcutánea e intravenosa y de muestreo de sangre) o mediante observaciones macroscópicas en la necropsia. Por otra parte, no se detectó sangre oculta en las heces al final del estudio. Además, no se produjo mortalidad y no hubo efectos relacionados con el artículo de prueba que aparecen en los signos clínicos, el peso corporal, consumo de alimentos, los parámetros electrocardiográficos y oftalmológicas, hematología, química clínica, o el análisis de orina. No se identificaron órganos diana de la toxicidad.

Se observó un aumento en el peso de la tiroides en los machos a 100 mg/kg vía SC. Sin embargo, la importancia toxicológica de este hallazgo no es concluyente, ya que no había correlatos histológicos. Hubo una gran variabilidad de los pesos de tiroides entre los animales, y el hallazgo estaba presente sólo en un sexo. Microscópicamente, se observó fibrosis dependiente de la dosis en los sitios de inyección SC en ambos sexos a 10 y 100 mg/kg / semana SC. Estos resultados no se consideraron adversos.

No se observaron datos de toxicidad significativos en estudios de toxicidad general de la administración de dosis única o dosis repetida en monos cynomolgus hasta 13 semanas. Por lo tanto, el nivel más alto de dosis SC administrado en el estudio de toxicidad GLP de 13 semanas (100 mg/kg / semana) se definió como el NOAEL.

Ejemplo 9

Farmacocinética en monos cynomolgus - dosis única

A los monos Cynomolgus (hembra, N = 2) se les administró una dosis única de 3 mg/kg de NOV1401, ya sea IV. o SC y se observó hasta que las concentraciones plasmáticas de FXI

y aPTT volvieron a los valores previos a la dosis. A los animales se les administró una dosis única de 10 mg/kg de NOV1401, ya sea IV. o SC. seguido 2 semanas más tarde por una dosis de 30mg/kg, ya sea IV o SC y otro período de observación de 2 semanas. La PK de NOV1401 se evaluó midiendo NOV1401 total. La exposición a NOV1401 total, medido por la concentración máxima observada total de NOV1401 (C_{max}) o el área bajo la curva concentración-tiempo total de NOV1401 (AUC_{0-14d}), fue comparable entre los animales individuales en cada grupo. La exposición (C_{max} o AUC_{0-14d}) fue aproximadamente proporcional a la dosis para cada vía de administración (Tabla 9). La C_{max} fue aproximadamente 3 veces mayor en el grupo IV que en el grupo SC. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas totales de NOV1401 fueron similares en ambos grupos después de la fase inicial de distribución. La vida media de eliminación terminal ($t_{1/2}$) se estimó para cada animal usando un modelo de dos compartimentos después de la administración de la dosis de 3 mg/kg. El $t_{1/2}$ varió de 14-15 días (N = 2). La biodisponibilidad absoluta tras la inyección SC osciló entre 61-66% (3 niveles de dosis). Los anticuerpos anti-NOV1401 no se detectaron después de la administración tanto IV como SC en ningún animal.

Tabla 9: La media de los parámetros Farmacocinéticos siguientes (ascendente) con una sola administración de la dosis en los monos cynomolgus hembra

Dosis (mg/kg)	Ruta	t_{max} (h) *	C_{max} (μ g / ml)	AUC_{0-14d} (μ g d / ml)
3	IV	0.25	96.0	544
3	SC	168	36.0	360
10	IV	0.25	325	1.810
10	SC	132	101	1.160
30	IV	1.08	1.170	6.770
30	SC	132	344	4,140

* T_{max} se informa como valor de la mediana.

Ejemplo 10

Toxicocinética en monos cynomolgus - dosis repetida

Los monos Cynomolgus recibieron dosis semanales de 10 mg o 100 mg/kg de NOV1401 SC por 13 semanas (14 dosis) o dosis de 50 mg/kg IV de NOV1401 durante 4 semanas (5 dosis). Los animales tratados con NOV1401 fueron expuestos a NOV1401 durante la fase de dosificación del estudio; no se observó exposición en los animales de control. No se observaron

diferencias relacionadas con el género en la exposición a plasma total NOV1401. El aumento de la exposición (tanto C_{max} y AUC_{0-7d}) fue proporcional a la dosis, tanto en animales hembras y machos (Tabla 10). Se detectaron anticuerpos anti-NOV1401 en 5 de 6 animales a 10 mg/kg / semana vía SC, en 1 de cada 10 animales a 100 mg/kg / semana SC, y en 1 de 6 animales a 50 mg/kg / semana IV. La exposición total a NOV1401 no se vio comprometida en ninguno de los grupos de dosis SC. Sólo un animal positivo al anticuerpo antidrogas (ADA) tenía una AUC_{0-7d} el día de estudio 22, que era más bajo que los otros animales del mismo grupo (50 mg/kg / semana IV). No hubo ningún impacto en la prolongación del aPTT en este animal y no se observó toxicidad.

Tabla 10 : Parámetros toxicocinéticos medios para la penúltima dosis (Día de Estudio 85 para la administración SC, Día de Estudio 22 para la administración IV) de 13 semanas / 4 semanas de estudio de toxicidad compatible con GLP en monos cynomolgus (macho y hembra combinados)

Dosis (mg/kg / semana)	Ruta	t_{max} (h) *	C_{max} (µg / ml)	AUC_{0-14d} (µg d / ml)
10	SC	24-120	719	3,100
100	SC	72-120	5.630	23.400
50	IV	0,25-96	1,990	10.700

* T_{max} se informa como el rango de valores observados.

Ejemplo 11

Estudio de escalado de dosis en humanos

Se llevan a cabo estudios en humanos para evaluar la seguridad y tolerabilidad de anticuerpos anti-FXI/FXIIa, como NOV1401, tras la administración de dosis única en sujetos sanos. Un total de aproximadamente 60 hombres sanos y mujeres posmenopausicas/ esterilizadas quirúrgicamente, sujetos entre 18 y 55 años, se inscriben en este estudio. La buena salud está determinada por la historia clínica pasada, el examen físico, el examen neurológico, los signos vitales, el electrocardiograma (ECG) y las pruebas de laboratorio en el examen de tamizaje. Los sujetos seleccionados pesan al menos 50 kg, y tienen un índice de masa corporal (IMC) en el intervalo de 18 a 35 kg/m². $IMC = \text{peso corporal (kg)} / [\text{altura (m)}]^2$.

Se probaron seis niveles de dosis SC de 5, 15, 50, 150, 300 y 600 mg en un estudio en seres humanos, siempre que la duración media prevista de la prolongación del aPTT ≥ 2 veces no persista durante ≥ 42 días a cualquier dosis ensayada. Se realizaron dos análisis intermedios (IA) para confirmar la selección de la dosis para los 2 niveles de dosis más altas. Si la duración media pronosticada por el modelo de la prolongación del aPTT es ≥ 2 veces durante más de 42

días con la dosis de 300 mg o la dosis de 600 mg, la dosis se puede bajar en función, por ejemplo, de las simulaciones del modelo, para asegurar que la duración media de la prolongación del aPTT no exceda de 2 veces durante ≥ 42 días. Los ajustes de dosis ejemplares no limitantes puede implicar la reducción de una dosis mediante decrementos de 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, o 50 mg.

Los tres primeros pasos de escalada de dosis se producen en incrementos de $\approx \log 1/2$. Las 2 últimas etapas de escalado de dosis son incrementos inferiores o iguales a 2 veces para mitigar el riesgo de saturación objetivo prolongada y extendida prolongación del aPTT.

La duración máxima de la prolongación de 2 veces aPTT durante un determinado número de días (*por ejemplo*, 30 días, 35 días, 40 días, 42 días, etc.) con una terapia dirigida a FXI se puede evaluar sobre la base de los datos genéticos que muestran el fenotipo de hemorragia leve en pacientes con deficiencia severa de FXI, los datos de los pacientes con deficiencia de FXI con inhibidores adquiridos, así como los datos de los estudios en humanos, por ejemplo, FXI-ASO (*ver, por ejemplo*, Liu *et al.*, (2011) "ISIS-FXIRx, un inhibidor novedoso antisentido específico del Factor XI, causó una reducción significativa en el antígeno y la actividad de FXI y aumentó aPTT sin causar sangrado en voluntarios sanos". Presentado en la 53^a reunión y exposición anual de la Sociedad Americana de Hematología, San Diego, California (Blood; 118: Abstract 209), donde la administración de dosis múltiples de FXI-ASO durante 6 semanas produjo un robusto agotamiento de FXI sostenido durante > 6 semanas (42 días), sin episodios de hemorragia. En ciertas realizaciones, un análisis basado en modelos predice que la máxima prolongación de aPTT de $\approx 2,7$ veces (en relación con la predosis) se puede lograr de forma transitoria en una dosis SC de 50 mg de NOV1401 (sujeto de 60 kg). En ciertas realizaciones, se predice que las dosis más altas prolongarán la duración de esta prolongación máxima de aPTT de 2.7 veces.

Los sujetos se controlan a lo largo del estudio en busca de parámetros de seguridad y/o los puntos finales, como, examen físico, examen neurológico, signos vitales, electrocardiograma (ECG), laboratorios de seguridad, y los acontecimientos adversos (AA), incluyendo AA graves (AAG) hasta e incluyendo el día 106 después de la dosis.

El efecto del anticuerpo anti-FXI/FXIa (*por ejemplo*, NOV1401) sobre aPTT se evalúa sobre la base de los cambios relativos de la línea de base. Las concentraciones plasmáticas de anticuerpo anti-FXI/FXIa totales (*por ejemplo*, NOV1401) se miden para evaluar la PK de dosis únicas en estos sujetos.

Para evaluar la inmunogenicidad (IG) de anticuerpos anti-FXI/FXIa (*por ejemplo*, NOV1401), se realizaron pruebas de detección y confirmación de ADA.

La actividad de coagulación FXI, FXI libre y total (FXI:C) se mide para evaluar los efectos de los anticuerpos anti-FXI/FXIa (*por ejemplo*, NOV1401) sobre el compromiso del objetivo y los parámetros PD relacionadas con el objetivo.

El dímero D, los fragmentos de protrombina 1.2 (F1.2) y el complejo de protrombina-antitrombina (TAT) se evalúan para determinar los efectos de los anticuerpos anti-FXI/FXIa (*por ejemplo*, NOV1401) en los parámetros de trombogénesis.

Para estudiar los efectos de los anticuerpos anti-FXI/FXIa (*por ejemplo*, NOV1401) sobre otros parámetros de coagulación, se pueden evaluar los siguientes: tiempo de protrombina (PT), el tiempo de trombina (TT), y los parámetros de exploración de coagulación de laboratorio como el inhibidor de fibrinólisis activable por trombina, fibrinógeno, activador del plasminógeno tisular (tPA) y TGA en los sujetos.

Los biomarcadores estudiados pueden incluir, pero no se limitarán a: dímero D, actividad FXI, PT/INR, TT, F1.2, fibrinógeno, TGA, la actividad de TFAI, TAT, antígeno PAI-1, actividad TFPi, actividad tPA y actividad del vWF.

Incorporación por referencia

Todas las referencias citadas en este documento, incluidas las patentes, solicitudes de patentes, documentos, publicaciones, libros de texto, y similares, y las referencias citadas en el mismo, se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

Equivalentes

La anterior memoria descriptiva se considera que es suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención. La descripción y los ejemplos anteriores, los detalles de ciertas realizaciones preferidas de la invención se describen del mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa lo detallado que pueda parecer en el texto, la invención puede ponerse en práctica de muchas maneras y la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualesquiera equivalentes de las mismas.