

ANTICUERPOS ANTI-FACTOR XII/XIIa Y SUS USOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[001]** La presente solicitud reivindica la prioridad con respecto a la solicitud provisional estadounidense n.º 63/514,392, presentada el 19 de julio de 2023, cuyo contenido se incorpora expresamente a modo de referencia a la presente memoria.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[002]** La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó de forma electrónica en formato .XML y se incorpora en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia .XML, creada el 18 de julio de 2024, se denomina «118003-11720.xml» y tiene un tamaño de 56,608 bytes. El listado de secuencias que se incluye en este archivo .XML es parte de la memoria descriptiva y se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

CAMPO

15 **[003]** La presente descripción se relaciona con anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos que se unen específicamente a factor de coagulación XII, y métodos terapéuticos y diagnósticos para utilizar esos anticuerpos.

ANTECEDENTES

20 **[004]** Los factores de coagulación, junto con las plaquetas, son componentes sanguíneos relevantes en el proceso de hemostasia durante una lesión vascular. Está establecido que estos componentes son impulsores de la trombosis cuando se producen desequilibrios en la regulación (es decir, producción y/o actividad). Se creía que las enfermedades trombóticas surgían principalmente de una activación aberrante en la vía extrínseca (a través del factor tisular), pero más recientemente, estudios preclínicos con ratones deficientes en *F12* y moléculas dirigidas al FXII activado (FXIIa) sugirieron que la vía intrínseca de la coagulación (también conocida como vía de contacto) también está involucrada (Renne y cols. 2005, *J. Exp. Med.* 202: 271-81; Larsson y cols. 2014, *Sci. Transl. Med.* 6: 222ra17). El FXIIa es
25 fundamental para la vía de contacto y puede impulsar la coagulación a través de la escisión del FXI o puede impulsar la inflamación a través de la escisión de la precalicreína plasmática. Por lo tanto, la inhibición de la actividad del FXII puede conducir a una reducción de la coagulación trombótica y de la inflamación asociadas con la activación de la vía de contacto (Schousboe 2007, *Biochem. Pharmacol.* 75: 1007-13; Danese y cols. 2016, *Semin. Thromb. Hemostat.* 42: 682-8; Weitz 2016, *Thromb. Res.* 141 compl. 2: S40-5). Los anticoagulantes que se utilizan actualmente en la técnica, como la heparina, son antitrombóticos eficaces, pero también aumentan el riesgo de hemorragia. Por lo tanto, es deseable desarrollar anticoagulantes que prevengan la trombosis sin aumentar el riesgo de hemorragia.

30 **[005]** Los anticuerpos monoclonales contra el FXII son conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en las Patentes/Publicaciones de EE. UU. Nos. 4963657, 5500349, 8119137, 8715672, 9856326, 9856325, 9518127, 20130095108, 20140072572, 20140072600, y en WO2006066878, WO2013014092, EP1830924B1, EP2734552A1 y EP2623110A1.

35 **[006]** Los anticuerpos totalmente humanos que se unen específicamente a la proteína FXII (activada) con alta afinidad y previenen la trombosis sin aumentar el riesgo de hemorragia
45 podrían ser importantes en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades asociadas al FXII (por ejemplo, trombosis, embolia, edema).

BREVE DESCRIPCIÓN

[007] La presente descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente a la forma activada de la proteína factor XII de coagulación (FXIIa). En determinadas modalidades, los anticuerpos también se unen a la forma zimógeno del factor XII (FXII). En determinadas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos totalmente humanos que se unen al FXII y también al FXIIa («aglutinantes duales FXII/FXIIa») con alta afinidad. Los anticuerpos de la presente descripción son útiles, entre otras cosas, para inhibir o neutralizar la actividad de la proteína FXII. En determinadas modalidades, los anticuerpos son útiles para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado al FXII en un sujeto. En determinadas modalidades, los anticuerpos pueden administrarse de forma profiláctica o terapéutica a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o trastorno asociado al FXII. En determinadas modalidades preferidas. En modalidades específicas, los anticuerpos previenen la trombosis sin aumentar el riesgo de hemorragia en un sujeto. Dichos anticuerpos pueden utilizarse como terapia anticoagulante sin aumentar el riesgo de hemorragia cuando se administran a un sujeto que lo necesite, junto con una dosificación menos frecuente en un sujeto con una enfermedad o trastorno asociado al FXII.

[008] Los anticuerpos de la descripción pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender solo una porción de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv), y pueden modificarse para afectar la funcionalidad, por ejemplo, para aumentar la persistencia en el huésped o para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy y cols., 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933). En determinadas modalidades, los anticuerpos pueden ser específicos.

[009] En un primer aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales recombinantes aislados o fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente al factor XII (FXII) y/o al factor XII activado (FXIIa). En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales totalmente humanos. En determinadas modalidades, los anticuerpos son «aglutinantes duales», capaces de unirse al FXII y al FXIIa.

[010] Los anticuerpos anti-FXII/FXIIa de ejemplo de la presente descripción se enumeran en las tablas 1 y 2 en la presente memoria. La tabla 1 establece los identificadores de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (HCVRs), las regiones variables de cadena ligera (LCVR), las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los anticuerpos de ejemplo. La tabla 2 establece los identificadores de la secuencia de ácido nucleico de las HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos de ejemplo.

[011] La presente descripción proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tenga al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con esta.

[012] La presente descripción proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tenga al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con esta.

[013] La presente descripción también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR

(HCVR/LCVR) que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la tabla 1. De acuerdo con determinadas modalidades, la presente descripción proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-FXII/FXIIa de ejemplo enumerados en la tabla 1. En determinadas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona una de las SEQ ID NO: 2/22 (por ejemplo, REGN9533) o 22/30 (por ejemplo, REGN9534).

[014] La presente descripción también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la tabla 1 que tiene no más de doce sustituciones de aminoácidos, y/o dicha LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la tabla 1 que tiene no más de diez sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y 22, dicha secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce sustituciones de aminoácidos. En otro ejemplo, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10 y 30, dicha secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos. En una modalidad, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-FXII/FXIIa o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y 22, dicha secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácidos, y/o dicha LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10 y 30, dicha secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácidos.

[015] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 indicadas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[016] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 indicadas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[017] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 indicadas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[018] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a

antígeno de estos que comprenden una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 indicadas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[019] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 indicadas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[020] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 indicadas en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[021] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3 y de LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 indicadas en la tabla 1 apareada con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 indicadas en la tabla 1. De acuerdo con determinadas modalidades, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-FXII ilustrativos enumerados en la tabla 1. En determinadas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/22 (por ejemplo, REGN9533) o 22/30 (por ejemplo, REGN9534).

[022] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmento de unión a antígenos de estos que comprende una HCVR y una LCVR, dicha HCVR que comprende la HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de aminoácidos que se enumera en la tabla 1 mediante el aminoácido 1, tal HCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de aminoácidos que se enumera en la tabla 1 mediante el aminoácido 1 y tal HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de aminoácidos que se enumera en la tabla 1 mediante el aminoácido 1. En determinadas modalidades, la presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos que comprende una HCVR y una LCVR, dicha LCVR que comprende la LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de aminoácidos que se enumera en la tabla 1 mediante el aminoácido 1, tal LCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de aminoácidos que se enumera en la tabla 1 mediante el aminoácido 1 y tal LCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de aminoácidos que se enumera en la tabla 1 mediante el aminoácido 1. Por ejemplo, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR que comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 4 mediante el aminoácido 1, tal HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que difiere

de la SEQ ID NO: 6 mediante el aminoácido 1, y tal HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 8 mediante el aminoácido 1. En otra modalidad de ejemplo, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una HCVR y una LCVR, tal LCVR comprende una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 12 mediante el aminoácido 1, tal LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 14 mediante el aminoácido 1, y tal LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 16 mediante el aminoácido 1.

[023] Como ejemplo adicional, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una HCVR y una LCVR, tal HCVR comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 24 mediante el aminoácido 1, tal HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 26 mediante el aminoácido 1, y tal HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 28 mediante el aminoácido 1. En otra modalidad de ejemplo, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden una HCVR y una LCVR, tal LCVR comprende una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 32 mediante el aminoácido 1, tal LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 14 mediante el aminoácido 1, y tal LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 34 mediante el aminoácido 1.

[024] La presente descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) que se incluyen dentro de cualquiera de los anticuerpos que se enumeran en la tabla 1. En determinadas modalidades, el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 se selecciona de una de las SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (por ejemplo, REGN9533), o 24-26-28-32-14-34 (por ejemplo, REGN9534).

[025] En una modalidad relacionada, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) que se incluyen dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR como se define mediante cualquiera de los anticuerpos de ejemplo que se enumeran en la tabla 1. Por ejemplo, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos que comprenden un conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 que se incluyen dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10 (por ejemplo, REGN9533) o 10/30 (por ejemplo, REGN9534). Los métodos y las técnicas para identificar las CDR dentro de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR se conocen en la técnica y se pueden usar para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR especificadas que se describen en la presente. Las convenciones de ejemplo que se pueden usar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de

AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales, y la definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani y cols., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); y Martin y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86:9268-9272 (1989). Las bases de datos públicas también están disponibles para identificar secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

[026] En determinadas modalidades, la presente descripción incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este que se une específicamente a FXII y/o FXIIa, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que se incluyen dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que se incluyen dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR), donde el HCVR comprende: (i) la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 22, (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 22, (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 22; o (iv) la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 22 que tienen no más de 12 sustituciones de aminoácidos; y la LCVR comprende: (i) la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 y 30, (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 y 30, (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 y 30; o (iv) la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 y 30 que tienen no más de 10 sustituciones de aminoácidos.

[027] La presente descripción proporciona anticuerpos anti-FXII/FXIIa o fragmentos de unión a antígenos de estos, que comprenden una cadena pesada (HC) y una cadena ligera (LC), donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 18, y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 20. En otra modalidad, y la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 36, y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 38. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 40, y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 20.

[028] En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-FXII/FXIIa, o fragmentos de unión a antígenos de estos, que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que alteran la función de la región Fc. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende una mutación en la región C_H2 o C_H3 que aumenta la actividad de unión a FcγR. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende al menos una mutación en uno o más aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en los aminoácidos en las posiciones 248, 250, 252, 254, 256, 257, 307, 311, 376, 380, 428, 433 y 434. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende al menos una mutación en uno o más

aminoácidos en las posiciones 252, 254 y 256. En algunas modalidades, la al menos una mutación en el dominio Fc comprende una posición de mutación 252 a Y, posición de mutación 254 a T; y/o la posición de mutación 256 a E. En algunas modalidades, la al menos una mutación en el dominio Fc aumenta la semivida del anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos de este, en plasma sanguíneo en comparación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este sin la mutación. En algunas modalidades, la semivida aumenta al menos 1,2 veces, preferentemente al menos 1,5 veces, en comparación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este sin la mutación.

[029] La presente descripción incluye anticuerpos anti-FXII/FXIIa que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas modalidades, puede ser útil la modificación para eliminar sitios de glicosilación no deseados o, un anticuerpo que carece de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacáridos, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase Shield y cols. (2002) JBC 277:26733). En otras aplicaciones, se puede realizar la modificación de galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[030] En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que muestran la unión dependiente de pH a FXII. Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que se unen a FXII con mayor afinidad a pH neutro que un pH ácido (es decir, menor unión a pH ácido).

[031] La presente descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que compiten por la unión específica a FXII o a FXIIa con un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, donde la HCVR y la LCVR tienen cada uno una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias HCVR y LCVR que se enumeran en la tabla 1.

[032] La presente descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que compiten en forma cruzada por la unión específica a FXII/FXIIa con un anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígenos de este que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, donde la HCVR y la LCVR tienen cada una, una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias HCVR y LCVR que se enumeran en la tabla 1.

[033] La presente descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que se unen al mismo epítipo como un anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígenos de este que comprende tres CDR de una HCVR y las tres CDR de una LCVR, donde la HCVR y la LCVR tienen cada una, una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias HCVR y LCVR que se enumeran en la tabla 1.

[034] En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este puede unirse específicamente a FXII y/o FXIIa en una forma agonística, es decir, puede mejorar o estimular la actividad y/o la unión a FXII/FXIIa; en otra modalidades, el anticuerpo puede unirse específicamente a FXII y/o FXIIa en una manera antagonística, es decir, puede bloquear la actividad y/o la unión a FXII.

[035] La presente descripción también proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígenos de estos que bloquean la unión de FXIIa a FXI. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que bloquea la unión de FXIIa a FXI puede unirse al mismo epítipo en FXIIa como FXI o puede unirse a un epítipo diferente en FXIIa como FXI.

[036] En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de la presente descripción son biespecíficos que comprenden una primera especificidad de unión a

un primer epítipo de FXII/FXIIa y una segunda especificidad de unión a un segundo epítipo de FXII/FXIIa donde el primer o segundo epítipos son distintos y no se superponen.

[037] En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que tiene una o más de las siguientes características: (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano; (b) se une a un factor XII (FXIIa) activado; (c) se une a FXII con una constante de disociación (K_D) de menos de 1,5 nM a 25 °C, según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (d) se une a FXII con una K_D de menos de 17nM a 37 °C, según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (e) se une a FXIIa con una K_D de menos de 5 nM, preferentemente de menos de 0,9 nM, a 25 °C según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (f) se une a FXIIa con una K_D de menos de 6,5 nM, preferentemente menos de 2,5 nM, a 37 °C según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (g) bloquea la generación de trombina mediante vía intrínseca a una concentración de menos de 250 nM, según lo medido mediante ensayos de plasma funcional; y/o (h) bloquea la generación de trombina mediante la vía intrínseca sin bloquear la generación de trombina mediante la vía extrínseca, según lo medido mediante ensayos de plasma funcional.

[038] En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-FXII/FXIIa o partes de estos. Por ejemplo, la presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR que se enumeran en la tabla 1; en determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[039] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR que se enumeran en la tabla 1; en determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[040] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 que se enumeran en la tabla 1; en determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR1 que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[041] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 que se enumeran en la tabla 1; en determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR2 que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[042] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 que se enumeran en la tabla 1; en

determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR3 que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[043] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 que se enumeran en la tabla 1; en determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR1 que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[044] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 que se enumeran en la tabla 1; en determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR2 que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[045] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 que se enumeran en la tabla 1; en determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR3 que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con estas.

[046] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), donde las secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3 es como se define mediante cualquiera de los anticuerpos que se enumeran en la tabla 1.

[047] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), donde las secuencias de aminoácidos de LCDR1-LCDR2-LCDR3 es como se define mediante cualquiera de los anticuerpos que se enumeran en la tabla 1.

[048] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR y una LCVR, donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR que se enumeran en la tabla 1 y donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR que se enumeran en la tabla 1. En determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de HCVR que se enumeran en la tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con respecto a estas, y una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de LCVR que se enumeran en la tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a estas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con respecto a estas. En determinadas modalidades, de acuerdo con este aspecto de la descripción, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y LCVR,

donde la HCVR y LCVR derivan del mismo anticuerpo anti-FXII que se enumera en la tabla 1.

[049] En un aspecto relacionado, la presente descripción proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Por ejemplo, la presente descripción incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR y/o CDR como se establecen en la tabla 2. En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona vectores de expresión que comprenden: (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una HCVR de un anticuerpo que se une a FXII/FXIIa, donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en secuencias que se enumeran en la tabla 1; y/o (b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una LCVR de un anticuerpo que se une a FXII/FXIIa, donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en secuencias que se enumeran en la tabla 1. También se incluyen dentro del alcance de la presente descripción células hospedadoras en las que se introdujeron dichos vectores, así como métodos para producir los anticuerpos o porciones de estos al cultivar las células huésped en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y recuperar los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos producidos de este modo. En determinadas modalidades, las células hospedadoras comprenden una célula de mamífero o una célula procariota. En determinadas modalidades, la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula *Escherichia coli* (*E. coli*). En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la descripción, dichos métodos comprenden introducir en una célula hospedadora un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una HCVR y/o LCVR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este unido de forma operativa a un promotor; cultivar la célula hospedadora en condiciones favorable para la expresión de la secuencia de ácido nucleico; y aislar el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este del medio de cultivo y/o la célula hospedadora. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígenos de este puede purificarse usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica previa.

[050] En un tercer aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico de al menos un anticuerpo monoclonal recombinante o fragmento de unión a antígenos de este que se une específicamente a FXII/FXIIa y un portador aceptable desde un punto de vista farmacéutico. En un aspecto relacionado, la descripción presenta una composición, que es una combinación de un anticuerpo FXII/FXIIa y un segundo agente terapéutico. En una modalidad, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combina ventajosamente con un anticuerpo anti-FXII/FXIIa. Los agentes de ejemplo que se pueden combinar de forma ventajosa con un anticuerpo anti-FXII/FXIIa incluyen, de modo no taxativo, otros agentes que se unen y/o inhiben la actividad de FXII (lo que incluye otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos, etc.) y/o agentes que no se unen directamente a FXII pero sin embargo, tratan o mejoran al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado a FXII. Las terapias de combinación adicionales y las coformulaciones que implican los anticuerpos anti-FXII de la presente descripción se describen en otra parte en la presente memoria.

[051] En un cuarto aspecto, la descripción proporciona métodos terapéuticos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con FXII en un sujeto que usa un anticuerpo anti-FXII/FXIIa o parte de unión al antígeno de un anticuerpo de la descripción, donde los métodos

terapéuticos comprenden administrar una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la descripción al sujeto que lo necesita. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejora, alivia, inhibe o previene mediante la inhibición de la actividad de FXII. En determinadas modalidades, la descripción proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado a FXII que comprende administrar una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico de un anticuerpo anti-FXII/FXIIa o fragmento de unión al antígeno de la descripción a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este pueden administrarse de forma profiláctica o terapéutica a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o trastorno asociado al FXII. En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este se administra en combinación con un segundo aspecto terapéutico al sujeto que lo necesita. El segundo agente terapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en un anticoagulante, un inhibidor de trombina directo, un fármaco trombolítico, un fármaco fibrinolítico, un fármaco antiplaquetario, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco antihipertensivo, un segundo anticuerpo anti-FXII, un fármaco hipolipemiente, la extracción mecánica de coágulos, la trombólisis guiada por catéter, medias de compresión, cirugía y cualquier otro fármaco o terapia conocida en la técnica. En determinadas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que ayude a contrarrestar o reducir cualquier posible/s efecto/s secundario/s asociado/s con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, en caso de que dicho/s efecto/s secundario/s lleguen a ocurrir. El anticuerpo o fragmento de este se puede administrar por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intraperitoneal, por vía oral o por vía intramuscular. El anticuerpo o fragmento de este se puede administrar con una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. En determinadas modalidades, un anticuerpo de la presente descripción se puede administrar con una o más dosis que comprenden entre 10 mg y 600 mg.

[052] La presente descripción también incluye el uso de un anticuerpo anti-FXII/FXIIa o fragmento de unión a antígenos de este de la descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se beneficiaría del bloqueo de la actividad y/o la unión a FXII/FXIIa.

[053] Otras modalidades serán evidentes luego de revisar la descripción detallada subsiguiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[054] La **FIG. 1A** muestra el curso de tiempo de las concentraciones de mAb y las concentraciones de hFXII/FXIIa medidas para cada ratón individual al que se le dosificó una única dosis de 10 mg/kg del anticuerpo parental anti-hFXII/FXIIa (REGN9533). La **FIG. 1B** muestra el curso de tiempo de las concentraciones de mAb y las concentraciones de hFXII/FXIIa medidas para cada ratón individual al que se le dosificó una única dosis de 10 mg/kg del anticuerpo variante YTE anti-hFXII/FXIIa (REGN17653). La **FIG. 1C** muestra el curso de tiempo de las concentraciones de mAb y las concentraciones de hFXII/FXIIa medidas para cada ratón individual al que se le dosificó una única dosis de 10 mg/kg del anticuerpo de control de anti-Fel D1 (REGN1945).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[055] Antes de que se describan los métodos de la presente, debe entenderse que esta descripción no se limita a los métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas,

ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir formas de realización particulares solamente, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

5 **[056]** A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que les otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio al cual pertenece la invención. Aunque es posible emplear cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente en la práctica o la evaluación de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales
10 preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan a esta en su totalidad mediante esta referencia.

Definiciones

15 **[057]** El término «FXII» también llamado «factor XII» hace referencia al factor XII de coagulación, también conocido como factor Hageman. La proteína FXII de 596 aminoácidos es la forma cimógena del factor XIIa, una serina proteasa plasmática betaglobulina compuesta por una cadena pesada amino terminal y una cadena ligera carboxi terminal. Su cadena pesada contiene dos dominios de tipo fibronectina (tipo I y II), dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico, un dominio Kringle y una región rica en prolina, y su cadena ligera
20 contiene el dominio proteasa. La exposición de la sangre a sustancias cargadas negativamente o a superficies artificiales desencadena la generación de trombina y la formación de fibrina a través de una serie de reacciones conocidas como activación por contacto. El factor XII activa el factor XI y la precalicreína en la cascada de la coagulación. El factor XII se activa a factor XIIa por la calicreína plasmática, los polifosfatos plaquetarios o bacterianos, el ADN o ARN extracelular, las heparinas liberadas por los mastocitos, los péptidos amiloides, los agregados
25 de proteínas mal plegadas y las superficies cargadas negativamente, como el vidrio. Este es el punto de inicio de la vía intrínseca. La secuencia de aminoácidos de la proteína FXII de longitud completa se ejemplifica mediante la secuencia de aminoácidos que se proporciona en UniProtKB/Swiss-Prot como número de acceso P00748,3. La secuencia de aminoácidos de la proteína FXII de longitud completa también se muestra como la SEQ ID NO: 65 en la presente memoria. El término «FXII» incluye la proteína FXII recombinante o un fragmento de esta. El término también abarca la proteína FXII o un fragmento de este acoplado a, por ejemplo, una
30 etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano o una secuencia de señal tal como ROR1.

35 **[058]** El término «anticuerpo», como se usa en la presente, pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro (es decir, «moléculas de anticuerpo completo», así como multímeros de estas (por ejemplo, IgM) o fragmentos de unión a antígenos de estas. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada («HCVR» o «V_H») y una región constante de cadena pesada (que se compone de los dominios C_H1, C_H2 y C_H3). Cada cadena ligera consiste en una región variable de cadena ligera («LCVR» o «V_L») y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR
40 y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En ciertas modalidades de la descripción, los FR del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) pueden ser idénticos a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de forma natural o artificial.

Una secuencia de consenso de aminoácidos puede definirse en función de un análisis lado a lado de dos o más CDR.

[059] La sustitución de uno o más residuos de CDR o la omisión de una o más CDR también es posible. Se han descrito anticuerpos en la bibliografía científica en los que una o dos CDR se pueden dispensar para su unión. Padlan y cols. (1995 FASEB J. 9:133-139) analizaron las regiones de contacto entre anticuerpos y sus antígenos, en función de estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que solamente alrededor de un quinto a un tercio de los residuos de CDR entra realmente en contacto con el antígeno. Padlan también encontró varios anticuerpos en los que una o dos CDR no presentaban aminoácidos en contacto con un antígeno (ver también Vajdos y cols. 2002 *J Mol Biol* 320:415-428).

[060] Los residuos de CDR que no se encuentran en contacto con el antígeno pueden identificarse de acuerdo con estudios previos (por ejemplo, normalmente no son necesarios los residuos H60-H65 en CDRH2) en regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de las CDR de Chothia, mediante modelado molecular y/o en forma empírica. Si se omite una CDR o residuo/s de esta, generalmente se sustituye con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpos humana o una de consenso de dichas secuencias. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDR y aminoácidos a sustituir también se pueden seleccionar empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras.

[061] Los anticuerpos monoclonales anti-FXII completamente humanos descritos en la presente pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena liviana y pesada en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondiente. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente con secuencias de líneas germinales disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente descripción incluye anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de estos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos aquí descritas, donde uno o más aminoácidos dentro de uno o más marcos y/o regiones CDR son mutados al/residuo/s correspondiente/s de la secuencia de línea germinal de la cual el anticuerpo fue derivado, o al/residuo/s correspondiente/s de otra secuencia de línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del(los) residuo/s de línea germinal correspondiente/s (tales cambios de secuencia se denominan en el presente colectivamente como «mutaciones de línea germinal»). Una persona experta en la técnica, partiendo de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en la presente memoria, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprendan una o más mutaciones individuales de la línea germinal o combinaciones de estas. En determinadas modalidades, todos los residuos de marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se mutan de vuelta a los residuos que se encuentran en la secuencia de línea germinal original de la que se derivó el anticuerpo. En otras modalidades, solo determinados residuos son mutados de vuelta a la secuencia original de la línea germinal, por ejemplo, solo los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos de marco y/o CDR están mutados al residuo o residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la que se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de la presente descripción pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las

regiones marco y/o CDR, por ejemplo, donde determinados residuos individuales se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular mientras que determinados otros residuos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez que se obtienen, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígenos que contienen una o más mutaciones de línea germinal pueden ser analizados fácilmente para determinar la presencia de una o más propiedades deseadas, tales como mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, mejores propiedades biológicas antagonistas o agonistas (según sea el caso), menor inmunogenicidad, etc. La presente descripción comprende los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno obtenidos de esta manera general.

[062] La presente descripción también incluye anticuerpos monoclonales anti-FXII completamente humanos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente descripción incluye los anticuerpos anti-FXII que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones conservativas de aminoácidos respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente memoria.

[063] Se pretende que el término «anticuerpo humano», como se usa en la presente, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mA b humanos de la descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término «anticuerpo humano», como se utiliza en la presente memoria, no pretende incluir mA b en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (p. ej., ratón), se han injertado en secuencias de FR humanas. La expresión incluye anticuerpos producidos de manera recombinante en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. La expresión no pretende incluir anticuerpos aislados o generados en un sujeto humano.

[064] El término «recombinante», como se usa en la presente, se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos de la descripción creados, expresados, aislados u obtenidos mediante tecnologías o métodos conocidos en la técnica como tecnología de ADN recombinante, que incluye, por ejemplo, corte y empalme de ADN y expresión transgénica. El término se refiere a los anticuerpos expresados en un mamífero no humano (incluidos mamíferos no humanos transgénicos, por ejemplo, ratones transgénicos), o un sistema de expresión celular (por ejemplo, células CHO) o aislados de un archivo de anticuerpos recombinantes combinatorios humanos.

[065] La expresión «se une específicamente» o «se une específicamente a», o similares, significa que un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede ser caracterizada mediante una constante de disociación de equilibrio de al menos alrededor de 1×10^{-8} M o menos (por ejemplo, una K_D menor implica una unión más fuerte). Son conocidos en la técnica métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales y similares. Como se describe en la presente, los anticuerpos se identificaron mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™, que se unen específicamente a FXII. Además, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a un dominio

en FXII y uno o más antígenos adicionales o un biespecífico que se une a dos regiones diferentes de FXII se consideran, no obstante, anticuerpos que «se unen específicamente», como se usa en la presente.

[066] El término anticuerpo con «alta afinidad» hace referencia a aquellos mAb que tienen una afinidad de unión a FXII expresada como K_D , de al menos 10^{-8} M; preferentemente 10^{-9} M; más preferentemente 10^{-10} M, incluso más preferentemente 10^{-11} M, según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad a la solución.

[067] El término «contante de disociación lenta», «Koff» o «kd» significa un anticuerpo que se disocia de FXII con una constante de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos preferentemente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™.

[068] El término «semivida» de un anticuerpo como se usa en la presente memoria hace referencia al tiempo que le lleva a la mitad de una cantidad dada de anticuerpos en eliminarse del torrente sanguíneo o eliminarse del cuerpo de un sujeto. En algunas modalidades, los mAb anti-hFXII/FXIIa de la descripción tienen una semivida de al menos 0,5 días, 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 15 días o 20 días.

[069] Las expresiones «parte de unión a antígeno» de un anticuerpo, «fragmento de unión a antígeno» de un anticuerpo y similares, tal como se usan en la presente memoria, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que se pueda obtener enzimáticamente, sintético o genéticamente alterado, que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Las expresiones «fragmento de unión a antígenos» de un anticuerpo, o «fragmento de anticuerpo», como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a la proteína FXII.

[070] En modalidades específicas, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de la descripción se pueden conjugar con un resto como un ligando o un resto terapéutico («inmunoconjugado»), un segundo anticuerpo anti-FXII o cualquier otro resto terapéutico útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado a FXII.

[071] Un «anticuerpo aislado» como se usa en la presente memoria, pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos (Ab) que tiene diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a FXII y/o FXIIa, o un fragmento de este, está sustancialmente libre de Ab que se unen específicamente a antígenos que no sean FXII o FXIIa.

[072] Un «anticuerpo de bloqueo» o un «anticuerpo neutralizante», como se usa en la presente memoria (o un «anticuerpo que neutraliza la actividad de FXII» o «anticuerpo antagonista»), pretende hacer referencia a un anticuerpo cuya unión a FXII/FXIIa produce la inhibición de al menos una actividad biológica de FXII. Por ejemplo, un anticuerpo de la descripción puede prevenir o bloquea la coagulación mediante la vía intrínseca.

[073] El término «resonancia de plasmones superficiales» tal como se utiliza en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo, utilizando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.).

[074] El término « K_D », tal como se utiliza aquí, está destinado a referirse a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

[075] El término «epítopo» se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como un parátipo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Así, diferentes

anticuerpos pueden unirse a diferentes zonas de un antígeno y tienen diferentes efectos biológicos. Además, el término «epítopo» se refiere a un sitio en un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. También se refiere a una región de un antígeno que se encuentra unida mediante un anticuerpo. Es posible definir los epítomos como estructurales o funcionales. Por lo general, los epítomos funcionales son un subconjunto de los epítomos estructurales y presentan los residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítomos también pueden ser conformacionales, es decir, estar compuestos de aminoácidos no lineales. En determinadas modalidades, los epítomos pueden incluir determinantes que son agrupamientos en la superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y en determinadas modalidades pueden presentar características estructurales tridimensionales específicas y/o características de cambio específicas.

[076] El término «competencia cruzada», como se usa en la presente memoria, significa que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a un antígeno e inhibe o bloquea la unión de otro anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. El término también incluye competencia entre dos anticuerpos en ambas orientaciones, es decir, un primer anticuerpo que se une y bloquea la unión del segundo anticuerpo y viceversa. En determinadas modalidades, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden unirse al mismo epítopo. De manera alternativa, el primer y segundo anticuerpo se pueden unir a diferentes epítomos superpuestos de manera que la unión de uno inhibe o bloquea la unión del segundo anticuerpo, por ejemplo, mediante impedimento estérico. La competencia cruzada entre anticuerpos se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de interferometría de biocapa sin etiquetas en tiempo real. La competencia cruzada entre dos anticuerpos se puede expresar como la unión del segundo anticuerpo que es menor que la señal de fondo debido a la autounión (donde el primer y segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo). La competencia cruzada entre 2 anticuerpos se puede expresar, por ejemplo, como % de unión del segundo anticuerpo que es menor que la unión de fondo propia de referencia (donde el primer y el segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo).

[077] Cuando se hace referencia a un ácido nucleico o un fragmento de este, las expresiones «identidad sustancial» o «sustancialmente idéntico» indican que, cuando se alinea de forma óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente un 90 %, y con mayor preferencia aproximadamente un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de las bases de nucleótidos, medida mediante cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analizó anteriormente. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos o una sustancialmente similar que el polipéptido codificado mediante la molécula de ácido nucleico de referencia.

[078] Aplicado a los polipéptidos, el término «similitud sustancial» o «sustancialmente similar» significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas de manera óptima, como por los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de brecha predeterminados, comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos un 95 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuo, que no son idénticas, difieren mediante sustituciones conservativas de aminoácidos. Una «sustitución de aminoácidos conservadora» es aquella en la que un residuo de aminoácidos se sustituye por otro residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una

sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí mediante sustituciones conservativas, el porcentaje o grado de similitud puede ser ajustado hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Las personas del oficio de nivel medio conocen medios para realizar este ajuste. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, el cual se incorpora en la presente por referencia. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que poseen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas con hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amidas: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz PAM250 de probabilidad logarítmica que se describe en Gonnet y cols. (1992) *Science* 256: 1443-45, el cual se incorpora en la presente por referencia. Un reemplazo «moderadamente conservador» es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

[079] La similitud de secuencia de los polipéptidos se mide típicamente mediante el uso de software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas hace coincidir secuencias similares mediante el uso de medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, que incluyen sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT los cuales pueden ser usados con parámetros predeterminados para determinar la homología de las secuencias o la identidad de las secuencias entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como los polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de esta. Véase, por ejemplo, GCG versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar mediante el uso de FASTA con parámetros predeterminados o recomendados; un programa del GCG versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos e identidades de secuencias porcentuales de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias problema y de búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la descripción con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente, BLASTP o TBLASTN, mediante el uso de parámetros predeterminados. Véase, por ejemplo, Altschul y cols. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia.

[080] Por la frase «cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico» se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el cual se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y el experto en la técnica la determinará mediante técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[081] Como se usa en la presente, el término «sujeto» hace referencia a un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano, que necesita mejora, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a FXII como trombosis o embolismo. El término incluye

sujetos humanos que tienen o están en riesgo de tener dicha enfermedad o trastorno.

[082] Como se utilizan en la presente memoria, los términos «tratar», «que trata» o «tratamiento» se refieren a la reducción o mejora de la severidad de al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado al FXII (Factor XII), debido a la administración de un agente terapéutico, como un anticuerpo de la presente descripción, a un sujeto que lo necesite. Los términos incluyen la inhibición de la progresión de la enfermedad o del empeoramiento de un síntoma/indicación. Los términos también incluyen un pronóstico positivo de la enfermedad, es decir, el sujeto puede quedar libre de la enfermedad o presentar una reducción de esta tras la administración de un agente terapéutico, tal como un anticuerpo de la presente descripción. El agente terapéutico puede administrarse en una dosis terapéutica al sujeto.

[083] Los términos «prevenir», «que previene» o «prevención» hacen referencia a la inhibición de la manifestación de una enfermedad o trastorno asociado a FXII o cualquier síntoma o indicación de dicha enfermedad o trastorno tras la administración de un anticuerpo de la presente descripción.

Fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos

[084] A menos que se indique específicamente de otro modo, el término «anticuerpo», como se usa en la presente memoria, se entenderá que abarca moléculas de anticuerpo que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, «moléculas de anticuerpo completas») así como también fragmentos de unión a antígenos de estas. Las expresiones «parte de unión a antígeno» de un anticuerpo, «fragmento de unión a antígeno» de un anticuerpo y similares, tal como se usan en la presente memoria, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que se pueda obtener enzimáticamente, sintético o genéticamente alterado, que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. La expresión «fragmento de unión a antígenos» de un anticuerpo, o «fragmento de anticuerpo», como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a la proteína FXII. Un fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento que contienen una CDR, o una CDR aislada. En determinadas modalidades, el término «fragmentos de unión a antígenos» hace referencia a un fragmento de polipéptido de una molécula de unión a antígenos multi-específica. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas mediante cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética recombinante que implican la manipulación y expresión del ADN que codifica los dominios variables y opcionalmente constantes de los anticuerpos. Tal ADN se conoce y/o se encuentra fácilmente disponible en, por ejemplo, fuentes comerciales, colecciones de ADN (que incluyen, por ejemplo, colecciones de anticuerpos-fagos), o puede sintetizarse. Es posible secuenciar y manipular el ADN químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

[085] Los ejemplos no taxativos de fragmentos de unión a antígenos incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena simple (scFv); (vi) fragmentos dAb y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en residuos aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado. Otras moléculas modificadas por ingeniería genética,

tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio simple, anticuerpos con dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos con CDR injertada, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), inmunofármacos modulares pequeños (SMIP)) y dominios IgNAR variables de tiburón, también están abarcadas dentro de la expresión «fragmento de unión al antígeno», como se usa en la presente.

[086] Por lo general, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y, por lo general, comprenderá al menos una CDR adyacente a una o más secuencias de marco o en el mismo marco que estas. En fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L se pueden ubicar uno con respecto a otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y puede contener dímeros $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ o $V_L - V_L$. De manera alternativa, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio monomérico V_H o V_L .

[087] En determinadas modalidades, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable ligado covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones de ejemplo no taxativas de dominios constantes y variables que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo de la presente descripción incluyen: (i) $V_H - C_H1$; (ii) $V_H - C_H2$; (iii) $V_H - C_H3$; (iv) $V_H - C_H1 - C_H2$; (v) $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (vi) $V_H - C_H2 - C_H3$; (vii) $V_H - C_L$; (viii) $V_L - C_H1$; (ix) $V_L - C_H2$; (x) $V_L - C_H3$; (xi) $V_L - C_H1 - C_H2$; (xii) $V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (xiii) $V_L - C_H2 - C_H3$; y (xiv) $V_L - C_L$. En cualquier configuración de dominios variables y constantes que incluyen cualquiera de las configuraciones de ejemplo mencionadas anteriormente, los dominios constantes y variables pueden estar ligados directamente entre sí o pueden estar ligados mediante una región ligadora o bisagra completa o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, lo que da como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula de polipéptido. Además, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente descripción puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante mencionadas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante puentes disulfuro).

[088] Como con moléculas de anticuerpo totales, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser mono-específicos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Normalmente, un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de un anticuerpo comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno independiente o a un epítipo diferente del mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluidos los formatos de anticuerpos biespecíficos de ejemplo descritos en la presente, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente descripción mediante el uso de técnicas de rutina disponibles en la técnica.

Preparación de anticuerpos humanos

[089] Los métodos para generar anticuerpos humanos en ratones transgénicos son conocidos en la técnica. Cualquiera de tales métodos conocidos puede ser utilizado en el contexto de la presente descripción para preparar anticuerpos humanos que se unen específicamente a FXII y/o FXIIa.

[090] Puede usarse un inmunógeno que comprende cualquiera de los siguientes para generar

anticuerpos contra la proteína FXII y/o FXIIa. En determinadas modalidades, los anticuerpos de la descripción se obtienen de ratones inmunizados con una proteína FXII o FXIIa natural de longitud completa (véase, por ejemplo, número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot P00748,3) o con ADN que codifica la proteína o fragmento de esta. Alternativamente, la proteína o un fragmento de la misma puede producirse usando técnicas bioquímicas estándar y modificarse y usarse como inmunógeno.

[091] En algunas modalidades, el inmunógeno puede ser una proteína FXII recombinante o un fragmento de esta expresado en *E. coli* o en cualquier otra célula eucariótica o de mamífero tal como células de ovario de hámster chino (CHO).

[092] Utilizando la tecnología VELOCIMMUNE® (véase, por ejemplo, el documento US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, inicialmente se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra FXII que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® involucra la generación de un ratón transgénico con un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y cadena ligera humanas enlazadas en forma operativa a los locus de región constante de ratón endógena de forma tal que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo se aísla y se liga operativamente a ADN que codifica las regiones constantes de las cadenas pesada y liviana humanas. El ADN luego se expresa en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

[093] Generalmente, un ratón VELOCIMMUNE® se expone al antígeno de interés, y se recuperan células linfáticas (tales como linfocitos B) de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas pueden fusionarse con una línea de células de mieloma para preparar líneas de células de hibridoma inmortales, y tales líneas de células de hibridoma se criban y seleccionan para identificar líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos específicos del antígeno de interés. El ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena liviana puede aislarse y ligarse a regiones constantes isotópicas convenientes de la cadena pesada y la cadena liviana. Tal proteína de anticuerpo puede producirse en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas liviana y pesada puede aislarse directamente de linfocitos específicos de antígeno.

[094] Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se describe en la sección experimental a continuación, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan en función de características deseables, que incluyen la afinidad, la selectividad, el epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo totalmente humano de la presente descripción, por ejemplo, IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificada. Si bien la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión al antígeno con alta afinidad y especificidad de diana residen en la región variable.

Bioequivalentes

[095] Los anticuerpos anti-FXII y los fragmentos de anticuerpo de la presente descripción abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían con respecto a las de los anticuerpos descritos pero que conservan la capacidad de unirse a la proteína anti-FXII. Tales anticuerpos y fragmentos de anticuerpo variantes comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia parental,

pero exhiben una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Asimismo, las secuencias de ADN que codifican anticuerpos de la presente descripción abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia descrita, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la descripción.

[096] Dos proteínas de unión al antígeno o anticuerpos se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes o alternativas farmacéuticos cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran en la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea dosis múltiple o individual. Algunos anticuerpos serán considerados equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el alcance de su absorción, pero no en su velocidad de absorción y aun se pueden considerar bioequivalentes dado que tales diferencias en la velocidad de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para el logro de concentraciones de fármaco eficaces en el cuerpo, por ejemplo, uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto de fármaco particular estudiado.

[097] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígenos son bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza o potencia.

[098] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si un paciente puede intercambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluso un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o disminución de la eficacia, en comparación con el tratamiento continuado sin tal cambio.

[099] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si ambos actúan mediante un mecanismo o mecanismos comunes de acción para la condición o condiciones de uso, en la medida en que tales mecanismos sean conocidos.

[0100] La bioequivalencia se puede demostrar mediante métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba in vivo en seres humanos u otros mamíferos, donde se mide la concentración del anticuerpo o sus metabolitos en la sangre, el plasma, el suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba in vitro correlacionada y razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad in vivo en seres humanos; (c) una prueba in vivo en seres humanos u otros mamíferos donde se mide el efecto farmacológico agudo adecuado del anticuerpo (o su diana) en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece seguridad, eficacia, biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

[0101] Las variantes bioequivalentes de los anticuerpos de la descripción se pueden construir al realizar, por ejemplo, diversas sustituciones de residuos o secuencias o al eliminar residuos o secuencias internos o terminales que no son necesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína no esenciales para la actividad biológica se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos, los cuales modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan la glicosilación.

Anticuerpos anti-FXII que comprenden variantes Fc

[0102] De acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, se proporcionan proteínas anti-FXII que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que

mejoran o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos anti-FXII que comprenden una mutación en la región C_H2 o una región C_H3 del dominio Fc, donde las mutaciones aumentan la afinidad del dominio Fc con FcRn en un entorno ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de alrededor de 5,5 a aproximadamente 6,0). Tales mutaciones pueden dar lugar a un aumento de la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitativos de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F), y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P). En incluso otra modalidad, la modificación comprende una modificación 265A (por ejemplo, D265A) y/o una 297A (por ejemplo, N297A). En una modalidad, la mutación comprende una modificación 252Y, 254T y 256E (variante «YTE»). En una modalidad, las mutaciones en el dominio Fc (por ejemplo, 252Y, 254T, y 256E) extienden la semivida del anticuerpo en el plasma sanguíneo, cuando se las compara con un anticuerpo no modificado. En una modalidad, las mutaciones en el dominio Fc (por ejemplo, 252Y, 254T, y 256E) reducen la tasas de eliminación del anticuerpo en el plasma sanguíneo, cuando se las compara con un anticuerpo no modificado.

[0103] Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos anti-FXII que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo M428L y N434S); 257I y 311I (por ejemplo P257I y Q311I); 257I y 434H (por ejemplo P257I y N434H); 376V y 434H (por ejemplo D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (por ejemplo T307A, E380A y N434A); y 433K y 434F (por ejemplo H433K y N434F). Todas las posibles combinaciones de las anteriores mutaciones del dominio Fc, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de anticuerpos divulgados en la presente, se contemplan dentro del alcance de la presente descripción.

[0104] La presente descripción también incluye anticuerpos anti-FXII que comprenden una región constante de cadena pesada (C_H) quimérica, donde la región C_H quimérica comprende segmentos derivados de las regiones C_H de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción pueden comprender una región C_H quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio C_H2 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana, o IgG4 humana, combinadas con parte o la totalidad de un dominio C_H3 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana, o IgG4 humana. De acuerdo con determinadas modalidades, los anticuerpos de la descripción comprenden una región C_H que tiene una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos «bisagra superior» (residuos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración de la UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, combinada con una secuencia «bisagra inferior» (residuos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración de UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4

humana. De acuerdo con determinadas modalidades, la región bisagra quimérica comprende residuos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de IgG1 humana o una IgG4 humana y residuos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región C_H quimérica que se describe en la presente puede, en determinadas modalidades, mostrar funciones efectoras Fc modificadas sin afectar negativamente las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 2014/0243504, cuya descripción se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad).

Características biológicas de los anticuerpos

[0105] En general, los anticuerpos de la presente descripción funcionan mediante la unión a la proteína FXII y la prevención de su escisión a FXIIa y FXIIb. En determinadas modalidades, los anticuerpos se unen a la forma activada del factor XII (FXIIa) («aglutinantes FXII/FXIIa duales»). Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos que se unen a la proteína FXII (por ejemplo, a 25 °C o a 37 °C) con una K_D de menos de 20 nM según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el forma de ensayo como se define en los ejemplos en la presente memoria. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos se unen a FXII con una K_D de menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 17 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de 0,5 nM, o menos de aproximadamente 0,3 nM según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el formato del ensayo como se define en los ejemplos en la presente, o un ensayo sustancialmente similar.

[0106] La presente descripción también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que se unen a la proteína FXII con una semivida disociativa (t_{1/2}) de más de 1 minuto según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o a 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en los ejemplos en la presente o un ensayo sustancialmente similar. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de la presente descripción se unen a la proteína FXII con una t_{1/2} de más de aproximadamente 5 minutos, más de aproximadamente 10 minutos, más de aproximadamente 20 minutos, más de aproximadamente 30 minutos, más de aproximadamente 40 minutos, más de aproximadamente 50 minutos, más de aproximadamente 60 minutos, más de aproximadamente 70 minutos, más de aproximadamente 80 minutos, más de aproximadamente 90 minutos, más de aproximadamente 100 minutos, más de aproximadamente 110 minutos, más de aproximadamente 120 minutos, o más de aproximadamente 125 minutos, según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o a 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el ejemplo 3 en la presente, o un ensayo sustancialmente similar.

[0107] La presente descripción incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos que se unen a la proteína FXIIa (por ejemplo, a 25 °C o a 37 °C) con una K_D de menos de 9 nM según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el forma de ensayo como se define en el ejemplo 3 en la presente memoria. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos se unen a FXIIa con una K_D de menos de aproximadamente 9 nM, menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de 350 pM, según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el formato del ensayo como se define en los

ejemplos en la presente, o un ensayo sustancialmente similar.

[0108] La presente descripción también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que se unen a la proteína FXIIa con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) de más de 1 minuto según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o a 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en los ejemplos en la presente o un ensayo sustancialmente similar. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de la presente descripción se unen a la proteína FXIIa con una $t_{1/2}$ de más de aproximadamente 5 minutos, más de aproximadamente 10 minutos, más de aproximadamente 20 minutos, más de aproximadamente 30 minutos, más de aproximadamente 40 minutos, más de aproximadamente 50 minutos, más de aproximadamente 60 minutos, o más de aproximadamente 70 minutos, según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o a 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en los ejemplos en la presente, o un ensayo sustancialmente similar.

[0109] La presente descripción incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos que se unen a la proteína FXIIab (por ejemplo, a 25 °C o a 37 °C) con una K_D de menos de 5 nM según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el forma de ensayo como se define en el ejemplo 3 en la presente memoria. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos se unen a FXIIab con una K_D de menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de 300 pM, según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el formato del ensayo como se define en los ejemplos en la presente, o un ensayo sustancialmente similar.

[0110] La presente descripción también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que se unen a la proteína FXIIab con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) de más de 1 minuto según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o a 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en los ejemplos en la presente o un ensayo sustancialmente similar. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de la presente descripción se unen a la proteína FXIIa con una $t_{1/2}$ de más de aproximadamente 5 minutos, más de aproximadamente 10 minutos, más de aproximadamente 20 minutos, más de aproximadamente 30 minutos, más de aproximadamente 40 minutos, o más de aproximadamente 50 minutos, según lo medido mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o a 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en los ejemplo en la presente, o un ensayo sustancialmente similar.

[0111] La presente descripción también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que inhiben la generación de trombina mediante la vía intrínseca a una concentración de menos de 250 nM, menos de 200 nM o menos de 150 nM, según lo medido, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se describe en los ejemplos en la presente memoria o un ensaya sustancialmente similar. En determinadas modalidades, la presente descripción también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de estos que inhiben la generación de trombina mediante la vía intrínseca sin bloquear la generación de trombina mediante la vía extrínseca, según lo medido, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se describe en los ejemplos en la presente memoria o un ensaya sustancialmente similar.

[0112] En una modalidad, la presente descripción proporciona un anticuerpo recombinante aislado o fragmento de unión a antígenos de este que se une específicamente a la proteína FXII, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este muestra una o más de las

siguientes características: (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano; (b) se une a un factor XII (FXIIa) activado; (c) se une a FXII con una constante de disociación (K_D) de menos de 1,5 nM a 25 °C, según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (d) se une a FXII con una K_D de menos de 17 nM a 37 °C, según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (e) se une a FXIIa con una K_D de menos de 5 nM, preferentemente de menos de 0,9 nM, a 25 °C según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (f) se une a FXIIa con una K_D de menos de 6,5 nM, preferentemente menos de 2,5 nM, a 37 °C según lo medido en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales; (g) bloquea la generación de trombina mediante vía intrínseca a una concentración de menos de 250 nM, según lo medido mediante ensayos de plasma funcional; y (h) bloquea la generación de trombina mediante la vía intrínseca sin bloquear la generación de trombina mediante la vía extrínseca, según lo medido mediante ensayos de plasma funcional.

[0113] Los anticuerpos de la presente descripción pueden poseer una o más de las características biológicas antes mencionadas, o cualquier combinación de estas. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente descripción serán evidentes para una persona del oficio de nivel medio a partir de una revisión de la presente descripción que incluye los ejemplos funcionales de la presente.

Mapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

[0114] La presente descripción incluye anticuerpos anti-FXII/FXIIa que interactúan con uno o más aminoácidos hallados dentro de una o más regiones de la molécula de proteína FXII/FXIIa que incluye, la cadena pesada y la cadena ligera. El epítipo al cual se unen los anticuerpos puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos ubicados dentro de cualquiera de los dominios antes mencionados de la molécula de proteína FXII (por ejemplo, un epítipo lineal en un dominio). De manera alternativa, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) ubicados dentro de cualquiera de los dominios antes mencionados o en ambos de la molécula de proteína (por ejemplo, un epítipo conformacional).

[0115] Se pueden utilizar diversas técnicas conocidas por las personas del oficio de nivel medio para determinar si un anticuerpo «interactúa con uno o más aminoácidos» dentro de un polipéptido o una proteína. Las técnicas de ejemplo incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo cruzado de rutina, como los descritos en *Antibodies*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Otro métodos incluyen análisis mutacional de escaneo de alanina, análisis de transferencia de péptidos (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), análisis de escisión de péptidos, estudios cristalográficos y análisis de RMN. Además, se pueden emplear métodos como la escisión de epítomos, la extracción de epítomos y la modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Otro método que puede utilizarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio consiste en etiquetar con deuterio la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína etiquetada con deuterio. A continuación, el complejo proteína/anticuerpo se transfiere a agua y los protones intercambiables de los aminoácidos protegidos por el complejo con el anticuerpo experimentan un retrointercambio de deuterio a hidrógeno a una velocidad menor que los protones intercambiables de los aminoácidos que no forman parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz proteína/anticuerpo pueden retener el deuterio y,

por lo tanto, exhibir una masa relativamente mayor en comparación con los aminoácidos que no están incluidos en la interfaz. Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a análisis de escisión por proteasa y espectrometría de masas, lo que revela los residuos etiquetados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0116] El término «epítopo» se refiere a un sitio en un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. Los epítomos de linfocitos B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen tras la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítopo incluye típicamente al menos 3, y más usualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

[0117] El Perfilado Asistido por Modificación (MAP, por sus siglas en inglés), también conocido como Perfilado de Anticuerpos Basado en la Estructura del Antígeno (ASAP), es un método que categoriza grandes cantidades de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra el mismo antígeno según las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a superficies de antígenos modificadas química o enzimáticamente (véase US 2004/0101920, incorporado aquí específicamente por referencia en su totalidad). Cada categoría puede reflejar un epítopo único ya sea claramente diferente de un epítopo que se representa en otra categoría, o que se superpone parcialmente con él. Esta tecnología permite filtrar rápidamente los anticuerpos que son genéticamente idénticos, de manera que la caracterización pueda concentrarse en los anticuerpos genéticamente diferentes. Cuando se aplica al cribado de hibridomas, el MAP puede facilitar la identificación de clones de hibridoma poco comunes que producen mAb con las características deseadas. El MAP puede utilizarse para clasificar los anticuerpos de la presente descripción en grupos de anticuerpos que se unen a diferentes epítomos.

[0118] En determinadas realizaciones, la presente descripción incluye anticuerpos anti-FXII y fragmentos de unión al antígeno de estos que interactúan con uno o más epítomos localizados dentro de la cadena pesada y/o ligera del FXIIa. El o los epítomos pueden consistir en una o más secuencias contiguas de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos ubicados dentro de la cadena pesada y/o cadena ligera de FXIIa. De manera alternativa, el epítopo puede consistir en múltiples aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) ubicados dentro de la FXIIa.

[0119] La presente descripción incluye anticuerpos anti-FXII que se unen al mismo epítopo, o una parte del epítopo, como cualquiera de los anticuerpos de ejemplo específicos que se enumeran en la tabla 1. Asimismo, la presente descripción también incluye anticuerpos anti-FXII que compiten por la unión a la proteína FXII o un fragmento de este con cualquiera de los anticuerpos de ejemplo específicos que se enumeran en la tabla 1. Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos anti-FXII que compiten por la unión a la proteína FXII con uno o más anticuerpos que se enumeran en la tabla 1.

[0120] Uno puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti-FXII de referencia, o compite para unirse con este, mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítopo como un anticuerpo anti-FXII de referencia de la descripción, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína FXII o péptido en condiciones de saturación. Luego, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula de la proteína FXII. Si el anticuerpo de prueba logra unirse al FXII tras la unión en

saturación con el anticuerpo anti-FXII de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo diferente que el anticuerpo anti-FXII de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la molécula de FXII tras la unión en saturación con el anticuerpo anti-FXII de referencia, el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo que el epítipo ligado por el anticuerpo anti-FXII de referencia de la descripción.

[0121] Para determinar si un anticuerpo compite por unirse con un anticuerpo anti-FXII de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se lleva a cabo en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína de FXII en condiciones de saturación seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula de FXII. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de FXII en condiciones de saturación seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de FXII. Si, en ambas orientaciones, solo el primer anticuerpo (que satura) es capaz de unirse a la molécula de FXII, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten para unirse a FXII. Como apreciará una persona del oficio de nivel medio, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia puede no unirse necesariamente al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia al unirse a un epítipo superpuesto o adyacente.

[0122] Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o epítipo superpuesto si cada uno inhibe (bloquea) competitivamente la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso 1, 5, 10, 20 o 100 veces mayor de uno de los anticuerpos inhibe la unión del otro en al menos un 50 %, pero preferiblemente en un 75 %, un 90 % o incluso un 99 %, según mediciones realizadas en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans y cols, *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

[0123] Luego se pueden llevar a cabo experimentos de rutina adicionales (por ejemplo, mutación de péptido y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de prueba se debe en realidad a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de esta clase se pueden llevar a cabo al usar ELISA, RIA, resonancia de plasmones superficiales, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión al anticuerpo cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica.

Inmunos conjugados

[0124] La descripción abarca un anticuerpo monoclonal anti-FXII humano a un resto terapéutico («inmunos conjugado») para tratar una enfermedad o trastorno asociado a FXII (por ejemplo, trombosis). Como se utiliza en la presente memoria, el término «inmunos conjugado» se refiere a un anticuerpo que está unido química o biológicamente a un agente radiactivo, una citocina, un interferón, una diana o fracción indicadora, una enzima, un péptido o proteína o un agente terapéutico. El anticuerpo puede estar unido al agente radiactivo, citocina, interferón, fracción diana o indicadora, enzima, péptido o agente terapéutico en cualquier ubicación a lo largo de la molécula siempre que sea capaz de unirse a su diana. Los ejemplos de inmunos conjugados incluyen conjugados anticuerpo-fármaco y proteínas de fusión de anticuerpo-toxina. En una modalidad, el agente puede ser un segundo anticuerpo diferente a la proteína FXII. El tipo de resto terapéutico que se puede conjugar con el anticuerpo anti-FXII

y que considerará la condición a tratar y el efecto terapéutico deseado a lograr. Se conocen en la técnica ejemplos de agentes adecuados para formar inmunocombinados; véase, por ejemplo, WO 05/103081.

5 Anticuerpos multiespecíficos

[0125] Los anticuerpos de la presente descripción pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión al antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt y cols., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer y cols., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

[0126] Cualquiera de las moléculas de unión al antígeno multiespecíficas de la presente descripción, o variantes de estas, puede construirse utilizando técnicas estándar de biología molecular (p. ej., ADN recombinante y tecnología de expresión de proteínas), tal como será conocido por un experto en la materia.

[0127] En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de FXII se generan en un formato biespecífico (un «biespecífico») en el cual las regiones variables que se unen a distintos dominios de la proteína FXII se enlazan entre sí para conferir una especificidad de dominio dual dentro de una única molécula de unión. Los biespecíficos diseñados adecuadamente pueden mejorar la eficacia inhibitoria general de la proteína FXII mediante el aumento tanto de la especificidad como de la avidéz de unión. Las regiones variables con especificidad para dominios individuales (p. ej., segmentos del dominio de extremo N), o que pueden unirse a diferentes regiones dentro de un mismo dominio, se emparejan en un armazón estructural que permite que cada región se una simultáneamente a los epítopos separados, o a diferentes regiones dentro de un mismo dominio. En un ejemplo para un biespecífico, las regiones variables de cadena pesada (V_H) a partir de un aglutinante con especificidad para un dominio se recombinan con regiones variables de cadena ligera (V_L) a partir de una serie de aglutinantes con especificidad para un segundo dominio para identificar compañeros V_L no similares que pueden combinarse con una V_H original sin afectar la especificidad original para esa V_H . De este manera, un segmento V_L único (por ej., V_{L1}) puede ser combinado con dos dominios diferentes V_H (es decir, V_{H1} y V_{H2}) para generar un biespecífico que comprende dos «brazos» de unión (V_{H1} - V_{L1} y V_{H2} - V_{L1}). La utilización de un segmento V_L único reduce la complejidad del sistema y así simplifica e incrementa la eficiencia de la clonación, expresión y los procesos de purificación utilizados para generar el biespecífico (Véase, por ejemplo, USSN13/022759 y US2010/0331527).

[0128] Alternativamente, los anticuerpos que se unen a más de un dominio y a una segunda diana, tal como, entre otros, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-FXII diferente, pueden prepararse en un formato biespecífico utilizando las técnicas descritas en la presente memoria u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Las regiones variables de anticuerpos que se unen a regiones distintas pueden enlazarse con regiones variables que se unen a sitios relevantes en, por ejemplo, el dominio extracelular del FXII, para conferir una especificidad de antígeno dual dentro de una única molécula de unión. Los biespecíficos de esta naturaleza, diseñados en forma adecuada, tienen una función doble. Las regiones variables con especificidad por el dominio extracelular se combinan con una región variable con especificidad por fuera del dominio extracelular, y se acoplan sobre un andamiaje estructural que permite que cada región variable se una a sus antígenos correspondientes de forma independiente.

[0129] Un formato de anticuerpo biespecífico de ejemplo que puede usarse en el contexto de la presente descripción implica el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina (Ig) y un

segundo dominio C_H3 de Ig, donde los dominios C_H3 de Ig primero y segundo difieren entre sí en al menos un aminoácido, y donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una modalidad, el primer dominio C_H3 de Ig se une a la proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a la proteína A, tal como una modificación H95R (según la numeración de exones de IMGT; H435R según la numeración de la UE). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (según IMGT; Y436F según la UE). Las modificaciones adicionales que se pueden encontrar dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (según IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I según la UE) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I según la UE) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (según IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I según la UE) en el caso de anticuerpos IgG4. Se contemplan en el alcance de la presente descripción variaciones del formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente.

[0130] Otros formatos ilustrativos que pueden usarse en el contexto de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, por ejemplo, formatos biespecíficos de diacuerpos o basados en scFv, fusiones IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, Quadroma, botones en ojales, cadena ligera común (por ejemplo, cadenas ligeras comunes con botones en ojales, etc.) CrossMab, CrossFab, (SEED)body, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de actuación dual (DAF) -IgG y formatos biespecíficos de Mab² (véase, por ejemplo, Klein y cols. 2012, mAb 4:6, 1-11, y las referencias citadas en este, para una reseña de los formatos anteriores). Los anticuerpos biespecíficos también pueden construirse con conjugación de péptido/ácido nucleico, por ejemplo, donde se usan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados de anticuerpo-oligonucleótido específicos del sitio que luego se autoensamblan para formar complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane y cols., *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: 4 de diciembre de 2012]).

Administración y formulaciones terapéuticas

[0131] La descripción proporciona composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-FXII o fragmentos de unión al antígeno de estos de la presente descripción. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la descripción se administrarán con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para proporcionar una transferencia, administración, tolerancia y similares mejoradas. Se puede encontrar una gran cantidad de formulaciones adecuadas en el vademécum conocido por todos los farmacéuticos: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (catiónicos o aniónicos) que contienen vesículas (tal como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones aceite-en-agua y agua-en-aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de varios pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell y cols. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

[0132] La dosis del anticuerpo puede variar según la edad y el tamaño de un sujeto al que se le administra, la enfermedad objetivo, las afecciones, la vía de administración y similares. Cuando se utiliza un anticuerpo de la presente descripción para tratar una enfermedad o trastorno en un paciente adulto, o para prevenir dicha enfermedad, resulta ventajoso

administrar el anticuerpo de la presente descripción normalmente en una dosis única de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Según la gravedad de la afección, es posible ajustar la frecuencia y la duración del tratamiento. En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este de la descripción se puede administrar como una dosis inicial de al menos aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 800 mg, aproximadamente 1 a aproximadamente 600 mg, aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg, o aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg. En determinadas modalidades, la dosis inicial puede seguirse de la administración de un segundo o una pluralidad de dosis posteriores del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este en una cantidad que puede ser aproximadamente la misma o menos que la de la dosis inicial, donde las dosis posteriores se separan en al menos 1 día a 3 días; al menos una semana, al menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9 semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

[0133] Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar la composición farmacéutica de la descripción, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y cols. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante perfusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La composición farmacéutica también puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

[0134] El uso de nanopartículas para suministrar los anticuerpos de la presente descripción también se contempla en la presente memoria. Se pueden usar nanopartículas conjugadas con anticuerpos tanto para aplicaciones terapéuticas como diagnósticas. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpo y métodos para preparar y el uso se describen con detalle en Arruebo, M., y cols. 2009 ("*Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications*" en *J. Nanomat.* volumen 2009, artículo ID 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), incorporado a la presente mediante referencia. Las nanopartículas se pueden desarrollar y conjugar con anticuerpos contenidos en composiciones farmacéuticas para dirigirse a células. Las nanopartículas para el suministro de fármaco se han descrito también en, por ejemplo, US 8257740, o US 8246995, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria en su totalidad.

[0135] En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad se puede utilizar una bomba. En otra modalidad, se pueden utilizar materiales poliméricos. En incluso otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo de la composición, lo que requiere así solo una fracción de la dosis sistémica.

[0136] Las preparaciones inyectables pueden incluir formas dosificadas para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracraneales, intraperitoneales e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden elaborarse mediante métodos conocidos públicamente.

[0137] Una composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse por vía

subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración por bolígrafo tiene aplicaciones claras para administrar una composición farmacéutica de la presente descripción. Cada dispositivo de administración por bolígrafo puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración por bolígrafo reutilizable generalmente utiliza un cartucho que se puede reemplazar que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se haya administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho esté vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y reemplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. Entonces, se puede volver a utilizar el dispositivo de administración por bolígrafo. En un dispositivo de administración por bolígrafo desechable, no hay cartucho que se pueda reemplazar. En su lugar, el dispositivo de administración por bolígrafo desechable viene precargado con la composición farmacéutica que se mantiene en una reserva dentro del dispositivo. Una vez que la reserva se vacía de la composición farmacéutica, el dispositivo entero se desecha.

[0138] Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas en la presente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo que contienen suele ser de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 500 mg por forma de dosificación en dosis unitaria; se prefiere, especialmente en forma de inyección, que el anticuerpo esté en aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 300 mg para las otras formas de dosificación.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

[0139] Los anticuerpos de la presente descripción son útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la coagulación (incluyendo trombosis y embolia) o el edema (p. ej., angioedema hereditario) y/o para mejorar al menos un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección. En determinadas modalidades, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une al antígeno de la descripción puede administrarse en una dosis terapéutica a un paciente con una enfermedad, trastorno o afección asociados con la coagulación o con el edema. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de este de la descripción se administra a un sujeto que lo necesita para prevenir la trombosis sin aumentar el riesgo de sangrado.

[0140] En determinadas modalidades, los anticuerpos de la presente descripción son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado a FXII que se selecciona del grupo que consiste en trombosis venosa, trombosis arterial, trombosis de dispositivos, tromboembolismo, angioedema hereditario, accidente cerebrovascular (o ictus), trombofilia, isquemia cardíaca, rotura de placa aterosclerótica, uso de prótesis valvulares mecánicas, uso de dispositivos médicos en contacto con la sangre, uso de circuitos extracorpóreos en contacto con la sangre, tromboembolismo venoso, embolia pulmonar, trombosis venosa profunda, trombosis de la vena porta, síndrome de Budd-Chiari, enfermedad de Paget-Schroetter, trombosis de la vena renal, trombosis de senos venosos cerebrales, trombosis de la vena yugular, trombosis del seno cavernoso, trombosis de la arteria hepática, isquemia de extremidades e infarto de miocardio.

[0141] Asimismo, en la presente memoria se contempla el uso profiláctico de uno o más anticuerpos de la presente descripción en sujetos con riesgo de trombosis, tales como sujetos que utilicen oxigenación por membrana extracorpórea (máquina de circulación extracorpórea).

Un anticuerpo de la descripción se puede utilizar para prevenir las oclusiones trombóticas del del oxigenador y del tubaje en el circuito extracorpóreo.

[0142] En una modalidad adicional de la descripción, los presentes anticuerpos se usan para la preparación de una composición farmacéutica o medicamento para tratar pacientes que sufren de una enfermedad, trastorno o afección que se describe en la presente memoria. En otra modalidad de la descripción, los presentes anticuerpos se utilizan como terapia adyuvante con cualquier otro agente o cualquier otra terapia conocida por los expertos en la técnica que sea útil para tratar o mejorar una enfermedad, trastorno o afección descrita en la presente memoria.

Tratamientos conjuntos

[0143] Las terapias de combinación pueden incluir un anticuerpo de la descripción y cualquier agente terapéutico adicional que pueda combinarse de forma ventajosa con un anticuerpo de la descripción, o con un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo de la descripción. Los anticuerpos de la presente descripción pueden combinarse sinérgicamente con uno o más fármacos o terapias utilizados para tratar una enfermedad o trastorno asociados con la trombosis, específicamente para prevenir la trombosis o para tratar a un sujeto en riesgo de trombosis debido a una enfermedad, trastorno o afección subyacentes (descritos en otra parte en la presente). En algunas modalidades, los anticuerpos de la descripción se pueden combinar con un segundo agente terapéutico para mejorar uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

[0144] Dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección, los anticuerpos de la presente descripción pueden utilizarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales que incluyen, entre otros, un anticoagulante (p. ej., warfarina, heparina, fenindiona, fondaparinux, idraparinux), un inhibidor de la trombina (p. ej., argatroban, lepirudina, bivalirudina o dabigatrán), un fármaco trombolítico, un fármaco antiagregante plaquetario (p. ej., aspirina), un antihipertensivo (p. ej., un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un betabloqueante, un bloqueante de los canales de calcio), un agente inmunosupresor (p. ej., vincristina, ciclosporina A o metotrexato), un agente fibrinolítico, un agente hipolipemiente (p. ej., una estatina o un inhibidor de la PCSK9 como el alirocumab), un fármaco antiinflamatorio (p. ej., un corticosteroide o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo), un segundo anticuerpo anti-FXII, la extracción mecánica de coágulos, la trombolisis guiada por catéter y la cirugía.

[0145] Como se utiliza en la presente memoria, la expresión «en combinación con» significa que el o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar antes, simultáneamente o después de la administración del anticuerpo anti-FXII de la presente descripción. La expresión «en combinación con» también incluye la administración secuencial o concomitante de un anticuerpo anti-FXII y un segundo agente terapéutico.

[0146] El o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto antes de la administración del anticuerpo de anti-FXII de la presente invención. Por ejemplo, se puede considerar que un primer componente se administra «antes que» un segundo componente si el primer componente se administra 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes o menos de 30 minutos antes de la administración del segundo componente. En otras modalidades, el o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto después de la administración del anticuerpo de anti-FXII de la presente descripción. Por ejemplo, se puede considerar que un primer componente se administra «después» un segundo componente si el primer componente se administra 30 minutos

después, 1 hora después, 2 horas después, 3 horas después, 4 horas después, 5 horas después, 6 horas después, 12 horas después, 24 horas antes, 36 horas después, 48 horas después, 60 horas después, 72 horas después o más después de la administración del segundo componente. En incluso otras modalidades, el o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto de forma concurrente con la administración del anticuerpo de anti-FXII de la presente descripción. La administración «concurrente», para los propósitos de la presente descripción, incluye, por ejemplo, la administración de un anticuerpo de anti-FXII y un componente terapéuticamente activo adicional a un sujeto en una forma de dosis única, o en formas de dosis separadas administradas al sujeto dentro de alrededor de 30 minutos o menos de distancia entre sí. Si se administran en formas dosificadas separadas, cada forma dosificada puede administrarse por la misma vía (p. ej., tanto el anticuerpo anti-FXII como el componente terapéuticamente activo adicional pueden administrarse por vía intravenosa, etc.); alternatively, cada forma dosificada puede administrarse por una vía diferente (p. ej., el anticuerpo anti-FXII puede administrarse por vía intravenosa y el componente terapéuticamente activo adicional puede administrarse por vía oral). En cualquier evento, administrar los componentes en una forma de dosis única, en formas de dosis separadas por la misma ruta, o en formas de dosis separadas por diferentes rutas son todas consideradas «administración concurrente», para los propósitos de la presente descripción. A efectos de la presente descripción, la administración de un anticuerpo anti-FXII «antes de», «simultáneamente con» o «después de» (tal como se definen dichos términos anteriormente en la presente memoria) la administración de un componente terapéuticamente activo adicional se considera administración de un anticuerpo anti-FXII «en combinación con» un componente terapéuticamente activo adicional.

[0147] La presente descripción incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-FXII de la presente descripción está coformulado con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales descritos en otra parte de la presente.

Usos de los anticuerpos en el diagnóstico

[0148] Los anticuerpos de la presente descripción se pueden utilizar para detectar y/o medir la FXII en una muestra, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Algunas modalidades contemplan el uso de uno o más anticuerpos de la presente descripción en ensayos para detectar una enfermedad o trastorno asociado a FXII. Los ensayos de diagnóstico de ejemplo para FXII pueden comprender, por ejemplo, poner una muestra, obtenida de un paciente, en contacto con un anticuerpo anti-FXII de la descripción, donde el anticuerpo anti-FXII está etiquetado con una etiqueta detectable o una molécula indicadora o se usa como ligando de captura para aislar selectivamente la FXII de las muestras del paciente. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo anti-FXII no etiquetado en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está en sí etiquetado de manera detectable. La molécula marcadora o informante detectable puede ser un radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente como un isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima como la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la peroxidasa de rábano picante o la luciferasa. Los ensayos de ejemplo específicos que pueden usarse para detectar o medir el FXII en una muestra incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0149] Las muestras que pueden usarse en ensayos de diagnóstico de FXII de acuerdo con la presente descripción incluyen cualquier muestra de tejido o fluido obtenible de un paciente que contenga cantidades detectables de la proteína FXII, o fragmentos de esta, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, se medirán los niveles de la proteína FXII en una

muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente que no padece una enfermedad asociada a FXII) para establecer inicialmente un nivel de referencia o estándar de FXII. Este nivel basal de FXII puede compararse entonces con los niveles de FXII medidos en muestras obtenidas de individuos de los que se sospecha que padecen una afección asociada al FXII, o síntomas asociados con dicha afección.

[0150] Los anticuerpos específicos para la proteína FXII pueden no contener marcadores o restos adicionales, o pueden contener un marcador o resto de extremo N o de extremo C. En una modalidad, el marcador o resto es biotina. En un ensayo de fijación, la ubicación de un marcador (si lo hay) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre la que se une el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de manera que la parte de extremo C del péptido estará distal a la superficie.

EJEMPLOS

[0151] Los siguientes ejemplos se establecen para proporcionar a las personas del oficio de nivel medio una invención y descripción completas de cómo se preparan y usan los métodos y composiciones de la invención, y no se pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran su descripción. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados, la temperatura ambiente es de alrededor de 25 °C y la presión es la atmosférica o cercana a ella.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos para proteínas del factor XII (FXII/FXIIa) activadas/factor XII

[0152] Se generaron anticuerpos humanos contra las proteínas FXII/FXIIa en un ratón VELOCIMMUNE®, el cual comprende ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana. Los ratones se inmunizaron con proteínas FXII y FXIIa humanas purificadas con plasma (Enzyme Research Laboratories).

[0153] Los anticuerpos anti-FXII también se aislaron directamente de linfocitos B de ratón positivas para antígeno sin fusión con células de mieloma, como se describe en la patente estadounidense n.º 7582298, que se incorpora específicamente a la presente a modo de referencia en su totalidad. Mediante el uso de este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-FXII completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos); los anticuerpos ejemplares generados de esta manera fueron denominados REGN9533 y REGN9534.

[0154] Las propiedades biológicas de los anticuerpos de ejemplo generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo se describen en detalle en los ejemplos establecidos a continuación.

Ejemplo 2: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos

[0155] La tabla 1 establece los identificadores de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena liviana o pesada y CDR de anticuerpos anti-FXII seleccionados de la descripción.

Tabla 1: Identificadores de secuencias de aminoácidos

	SEQ ID NO:	
--	------------	--

Designación de anticuerpo	HCVR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC	LC
REGN9533	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
REGN9534	22	24	26	28	30	32	14	34	36	38

[0156] Los identificadores de secuencias de ácidos nucleicos correspondientes se establecen en la tabla 2.

Tabla 2: Identificadores de secuencias de ácido nucleico

Designación de anticuerpo	SEQ ID NO:									LC
	HCVR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC	
REGN9533	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
REGN9534	21	23	25	27	29	31	16	33	35	37

5

[0157] Los anticuerpos a los que se hace referencia en la presente memoria normalmente tienen regiones variables completamente humanas, pero pueden tener regiones constantes humanas o de ratón. Sin embargo, tal como comprenderán los expertos en la técnica, un anticuerpo con un isotipo de Fc en particular pueden convertirse en un anticuerpo con un isotipo de Fc distinto (por ejemplo, un anticuerpo con un Fc IgG1 de ratón puede convertirse en un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en todo caso, los dominios variables (inclusive las CDR) – que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la tabla 2 – siguen siendo los mismos y se espera que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares sin importar la naturaleza del dominio de Fc. En determinadas modalidades, los anticuerpos seleccionados con un Fc de IgG1 de ratón se convirtieron en anticuerpos con Fc de IgG4 humana. En una modalidad, el dominio Fc de IgG4 comprende 2 o más cambios de aminoácido como se describe en US20100331527. En una modalidad, el Fc de IgG4 humana comprende una mutación de serina a prolina en la región bisagra (S108P) para promover la estabilización del dímero.

20 Construcciones de control que se utilizan en los siguientes ejemplos

[0158] Se incluyeron las siguientes construcciones de control (anticuerpos anti-FVII) en los experimentos que se describen en la presente para fines comparativos: «Comparador 1» un anticuerpo monoclonal contra la FXII/FXIIa que tiene secuencias V_H/V_L del anticuerpo «3F7» de acuerdo con EP20110175105 (CSL Behring GmbH); y el «Comparador 2» un anticuerpo monoclonal humano contra la FXII humana que tiene secuencias V_H/V_L del anticuerpo «15H8» de acuerdo con WO 2014/089493 (Vanderbilt Univ./Aronora).

Ejemplo 3: Cinética de unión de Biacore de anticuerpos monoclonales anti-FXII que se unen a diferentes reactivos FXII medidos a 25 °C

30 [0159] Se determinaron las constantes de disociación de equilibrio (KD) para la unión de diferentes reactivos FXII a anticuerpos monoclonales anti-FXII purificados utilizando un biosensor Biacore 8K basado en resonancia de plasmones superficiales en tiempo real. Todos

los estudios de unión se llevaron a cabo en HEPES 10 mM, NaCl 300 mM y tensioactivo Tween-20 al 0,05 % v/v, pH 7,4 (HBS-P) solución tampón de migración a 25 °C. La superficie del chip sensor Biacore CM5 se derivó primero mediante acoplamiento de aminas con el anticuerpo monoclonal específico Fc antihumano de ratón (REGN2567) para capturar los anticuerpos monoclonales anti-FXII y un control de isotipo relevante. Se realizaron estudios de unión sobre FXII, FXIIa y FXIIab humanos. Diferentes concentraciones de hFXII, hFXIIa y hFXIIab (30 nM - 1,11 nM; dilución en serie 3 veces) se prepararon primero en tampón de migración HBS-P y se inyectaron sobre la superficie del anticuerpo monoclonal anti-FXII capturado con Fc antihumano durante 3 minutos a un caudal de 30 µL/minuto, mientras que la disociación del reactivo del FXII unido al anticuerpo monoclonal se monitoreó durante 8 minutos en tampón de migración HBS-P. La tasa de asociación (k_a) y la tasa de disociación (k_d) se determinaron ajustando los sensogramas de unión en tiempo real a un modelo de unión 1:1 con limitación de transporte de masa usando el software Insight Evaluación de Biacore. Se calcularon la constante de equilibrio de disociación de unión (KD) y la semivida ($t_{1/2}$) disociativa a partir de las tasas cinéticas como:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ y } t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Se muestran los parámetros cinéticos de unión para hFXIIa, hFXIIab, o hFXII, que se unen a diferentes anticuerpos monoclonales anti-FXII de la invención a 25 °C en las tablas 3 hasta la 5.

A los 25 °C, los anticuerpos monoclonales anti-FXII unidos al hFXIIa con valores de KD que estaban en el intervalo entre 322 pM y 2,09 nM, como se muestra en la tabla 3. A los 25 °C, los anticuerpos monoclonales anti-FXII se unieron al hFXIIab con valores de KD que estaban en el rango entre 264 pM y 2,59 nM, y REGN4026 no se unieron a hFXIIab como se muestra en la tabla 4. A los 25 °C, los anticuerpos monoclonales anti-FXII se unieron al hFXII con valores de KD que estaban en el rango entre 233 pM y 27,5 nM, REGN3059 no se unieron a hFXII como se muestra en la tabla 5.

Tabla 3: Parámetros cinéticos de unión de hFXIIa que se une a anticuerpos monoclonales FXII a 25 °C.

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN9533	268,9±2,6	219,8	5,44E+05	1,75E-04	3,22E-10	65,8
REGN9534	290,8±5,7	228,4	7,50E+05	6,39E-04	8,51E-10	18,1
COMP3059	300,9±1,3	185,2	5,88E+05	9,54E-04	1,62E-09	12,1
REGN4026	229,9±0,8	80,2	1,95E+06	4,08E-03	2,09E-09	2,8
REGN1945	459±1,5	4,8	NB	NB	NB	NB

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión de hFXIIab que se une a anticuerpos monoclonales FXII a 25 °C.

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN9533	268,1±2,4	99,8	8,54E+05	2,26E-04	2,64E-10	51,1

REGN9534	291,4±9,6	102,8	1,42E+06	9,22E-04	6,51E-10	12,5
COMP3059	300,7±0,5	97,2	8,06E+05	2,09E-03	2,59E-09	5,5
REGN4026	229,8±1,0	7,4	NB	NB	NB	NB
REGN1945	458,5±1,0	2,6	NB	NB	NB	NB

NB = Sin unión (~2 veces por encima del control del isotipo REGN1945 unido a RU)

Tabla 5: Parámetros cinéticos de unión de hFXIIa que se une a anticuerpos monoclonales FXII a 25 °C.

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN9533	267,6±2,9	214,8	3,95E+05	9,20E-05	2,33E-10	125,6
REGN9534	291±8,7	222,3	4,42E+05	4,52E-04	1,02E-09	25,6
COMP3059	300,5±1,5	14,2	NB	NB	NB	NB
REGN4026	229,2±0,8	31,1	2,65E+05	7,29E-03	2,75E-08	1,6
REGN1945	457,5±1,4	10,9	NB	NB	NB	NB

NB = Sin unión (~2 veces por encima del control del isotipo REGN1945 unido a RU)

Ejemplo 4: Competencia cruzada por Octet entre diferentes anticuerpos monoclonales anti-FXII mediante el método de pre-complejo

[0160] La competencia de unión entre anticuerpos monoclonales anti-FXII se determinó mediante un ensayo de interferometría de biocapa en tiempo real y sin etiqueta en un biosensor OctetHTX (Pall ForteBio Corp.). Todo el experimento se realizó a 25 °C en 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,05 % v/v de tensioactivo Tween-20, 0,1 mg/ml de BSA (tampón de HBS-P) con la placa agitándose a una velocidad de 1000 rpm. Para evaluar si 2 anticuerpos eran capaces de competir entre sí por la unión a sus epítomos respectivos en un FXIIa humano (ERL), primero se capturaron alrededor de 1,38-2,32 nm de anticuerpo monoclonal anti-FXII humano sobre puntas de biosensor Octet recubiertas con anticuerpo anti-hFc (Pall ForteBio Corp., n.º 18-5060), sumergiendo las puntas durante 5 minutos en pocillos que contenían una solución de 50 µg/mL de anticuerpo monoclonal anti-FXII humano (denominado posteriormente como mAb-1) Posteriormente, las puntas del biosensor con el anticuerpo capturado se saturaron con un anticuerpo monoclonal de control de isotipo IgG4 irrelevante (denominado en adelante como mAb de bloqueo), sumergiéndolas durante 10 minutos en pocillos que contenían una solución de 200 µg/mL de dicho mAb de bloqueo. Posteriormente, las puntas del biosensor se sumergieron en pocillos que contenían una solución de co-complejo de 25 nM de hFXIIa y 1 µM de un segundo anticuerpo monoclonal anti-FXII humano (denominado en adelante como mAb-2), que había sido preincubado durante 2 horas. Las puntas del biosensor se lavaron en tampón HBS-P entre cada paso del experimento. La respuesta de unión en tiempo real se monitoreó durante el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada paso. Se corrigió la respuesta de unión del mAb-2 pre-complejado con FXII humano al mAb-1 capturado restando la unión de fondo, se comparó, y se determinó el comportamiento competitivo o no competitivo de los diferentes anticuerpos monoclonales anti-FXII.

[0161] La Tabla 6 define explícitamente las relaciones de los anticuerpos que compiten en ambas direcciones, independientemente del orden de unión.

Tabla 6: Competencia cruzada de anticuerpos anti-hFXII por la unión al FXII humano.

mAb-1 preunido capturado usando biosensores Octet AHC	mAb-2 bloqueado por mAb-1
REGN9533	REGN9533
	REGN9534
REGN9534	REGN9533
	REGN9534
	REGN3059
REGN3059	REGN9534
	REGN3059
REGN4026	REGN4026

Ejemplo 5: Caracterización funcional *in vitro* de REGN9533 y REGN9534 en ensayos de coagulación (aPTT, PT), ensayo de generación de trombina (TGA), ensayo de lisis del coágulo y ensayo de actividad de la calicreína plasmática con plasma de humano, cinomolgo y ratón F12^{hu/hu}

Determinación de aPPT

[0162] El aPTT se determinó en el Analizador de Hemostasia Diagnostica Stago STart4 (Daignostica Stago, Parsippany, NJ) de la siguiente manera: Se añadió un total de 50 µl de plasma humano normal combinado a una cubeta a 37 °C. Transcurrido 1 minuto, se añadieron a la cubeta 5 µL de un artículo de prueba (anticuerpo o inhibidor de molécula pequeña) en diluciones seriadas al doble (2x) en PBS y se dejó incubar durante 5 minutos. Después, se añadieron 50 µL de APTT-XL Ácido Elágico (Thermo Scientific) y se dejó incubar durante 300 segundos antes de añadir 50 µL de cloruro de calcio 20 mM (Thermo Scientific) para iniciar la reacción. El tiempo de coagulación medido para la concentración del artículo de prueba se normalizó con el tiempo de coagulación del plasma de referencia (sin fármaco) y se representó gráficamente frente a la concentración logarítmica molar del artículo de prueba. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 5 (GraphPad) para obtener el tiempo de duplicación de la concentración (C_{2xt}).

Determinación de PT

[0163] El PT se determinó en el Analizador de Hemostasia Diagnostica Stago STart4 de la siguiente manera. Se añadió un total de 50 µl de plasma humano normal combinado a una cubeta a 37 °C. Transcurrido 1 minuto, se añadieron a la cubeta 5 µL de un artículo de prueba (anticuerpo o inhibidor de molécula pequeña) en diluciones seriadas al doble (2x) en PBS y se dejó incubar durante 5 minutos. Después, se añadieron 100 µL de factor Tisular (TriniCLOT PT Excel, Diagnostica Stago) para iniciar la reacción. El tiempo de coagulación medido para la concentración del artículo de prueba se normalizó con el tiempo de coagulación del plasma de referencia (sin fármaco) y se representó gráficamente frente a la concentración logarítmica molar del artículo de prueba. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 5 (GraphPad) para obtener el tiempo de

duplicación de la concentración (C_{2xt}).

Determinación de TGA con ácido elágico

[0164] Se determinó el perfil de generación de trombina en un trombograma automático calibrado Diagnostica Stago de la siguiente manera: Se añadió un total de 55 μ L de plasma humano normal combinado a un pocillo de una microplaca a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 5 μ L de un artículo de prueba (anticuerpo o inhibidor de molécula pequeña) en diluciones seriadas al doble (2x) en PBS al pocillo de la microplaca y se dejó incubar durante 30 min. Se diluyeron 15 μ L de APTT-XL Ácido Elágico (Thermo Scientific) en reactivo MP, se añadieron al pocillo y se dejaron incubar durante 30 min. Después, se añadieron 15 μ L de sustrato Fluo-Ca (Fluo Flu Cal, Diagnostica Stago) inmediatamente antes de una lectura continua de la microplaca durante 90 min. Los valores medidos de concentración de trombina en tiempo real se trazaron en función del tiempo para obtener un perfil de trombograma para cada concentración del artículo de prueba utilizado.

Determinación de TGA con factor tisular

[0165] Se determinó el perfil de generación de trombina en un trombograma automático calibrado Diagnostica Stago de la siguiente manera: Se añadió un total de 55 μ L de plasma humano normal combinado a un pocillo de una microplaca a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 5 μ L de un artículo de prueba (anticuerpo o inhibidor de molécula pequeña) en diluciones seriadas al doble (2x) en PBS al pocillo de la microplaca y se dejó incubar durante 30 min. Se añadieron 15 μ L de Reactivo PPP de factor Tisular (Diagnostica Stago) al pocillo y se dejó incubar durante 30 min. Después, se añadieron 15 μ L de sustrato Fluo-Ca (Fluo Flu Cal, Diagnostica Stago) inmediatamente antes de una lectura continua de la microplaca durante 90 min. Los valores medidos de concentración de trombina en tiempo real se trazaron en función del tiempo para obtener un perfil de trombograma para cada concentración del artículo de prueba utilizado.

Determinación de la lisis del coágulo

[0166] Se determinó la lisis del coágulo en un lector de microplacas capaz de leer a OD405 nm en modo cinético durante 3 horas a 37 °C. Se agregó un total de 50 μ L de plasma humano normal combinado a cada pocillo de experimento en una microplaca de 96 pocillos a 37 °C. Se agregaron 5 μ L de un artículo diluido en serie 2x (anticuerpo o inhibidor de molécula pequeña) en PBS al pocillo del experimento y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Luego se agregan 50 μ L de mezcla de activación a cada pocillo (la conc. final de ácido elágico en ensayo 62,5 nM o factor de tejido en ensayo 0,125 pM con tPA 50 ng/mL en total 100 μ L/pocillo del ensayo) e inmediatamente se leyeron cada 30 s durante 180 min en modo cinético de OD405 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices i3 system). Se definió el tiempo de lisis de coágulos (CLT) midiendo el tiempo entre la curva de formación de coágulos al 50 % y la curva de lisis de coágulos al 50 %.

Determinación de la actividad de la calicreína plasmática

[0167] Se determinó la actividad de la calicreína plasmática en un lector de microplacas capaz de leer a OD_{405nm} en modo cinético durante 1 hora a 37 °C. Las muestras plasmática se diluyeron (500 veces para el ser humano, 250 veces para Cyno o 500 veces para ratón) en 20 mM de tampón HBS. A cada pocillo, se agregaron 100 μ L de plasma diluido junto con 20 μ L de mAb y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de la activación de 10 min con sulfato

de dextrano (DXS; 5 μ L de 100 μ g/ml DXS). Se añadieron 25 μ L de sustrato de calicreína 1 mM (concentración final de 0,167 mM en el ensayo) a cada pocillo y luego se leyó inmediatamente en un lector de microplacas para medir la $V_{m\acute{a}x}$ (cambio máximo de la DO a 405 nm por minuto). Se corrigieron todas las lecturas de $V_{m\acute{a}x}$ restando la $V_{m\acute{a}x}$ del blanco (tampón de ensayo HBS) y luego se graficaron frente al logaritmo de la concentración molar del artículo de prueba. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism 8 (GraphPad) para obtener la IC₅₀ (concentración inhibitoria máxima media).

Resumen de resultados y conclusiones:

[0168] Se generaron curvas de respuesta a la dosis para determinar el efecto de anti-FXII/FXIIa sobre el aPTT y el PT en un pool de plasma humano normal «sano». El comparador, COMP3059, que es un anticuerpo anti-FXIIa, prolongó el TTPa al triple respecto al valor basal sin afectar el TP hasta una dosis de 600 nM (Tablas 7a y 7d). Los mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron (REGN9533 y REGN9534) prolongaron el TTPa aproximadamente 7 veces y 6 veces, respectivamente, respecto al valor basal hasta una dosis de 600 nM sin aumentar el TP (Tablas 7b-7c, 7e-7f). La eficiencia del fármaco para inhibir la actividad de coagulación se indexa mediante una concentración arbitraria de «tiempo de duplicación», que es la concentración de fármaco requerida para prolongar el tiempo de coagulación al doble del valor basal. Los mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron, REGN9533 y REGN9534, alcanzaron un tiempo de duplicación con ~125 y ~200 nM, respectivamente, de manera similar a COMP3059, que también requirió 200 nM. No se observó que ninguno de los dos mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron duplicara el tiempo de coagulación del TP a la dosis máxima probada de 600 nM; lo mismo ocurrió con el COMP3059. En plasma de una mezcla de monos *Cynomolgus* «sanos» normales, los mAb anti-FXII/FXIIa fueron menos eficaces a dosis de hasta 600 nM, ya que el REGN9533 prolongó el TTPa aproximadamente 3,2 veces, mientras que el REGN9534 lo prolongó aproximadamente 1,9 veces, en tanto que el COMP3059 alcanzó 1,5 veces por encima del valor basal (Tablas 8a-8f). El tiempo de duplicación para el TTPa fue de 250 nM para REGN9533 y >600 nM para REGN9534 y COMP3059. El TP se mantuvo sin cambios y no alcanzó un tiempo de duplicación para ninguno de los mAb a dosis de hasta 600 nM (Tablas 8d-8f). En plasma de una mezcla de ratones «sanos» normales *F12^{hu/hu}*, los mAb anti-FXII/FXIIa tuvieron una eficacia reducida a dosis de hasta 600 nM, ya que el REGN9533 y el REGN9534 prolongaron el TTPa aproximadamente 2.X veces, mientras que el COMP3059 alcanzó aproximadamente 1,9 veces por encima del valor basal (Tablas 9a-9f). El tiempo de duplicación para el TTPa fue de ~ 250 nM para REGN9533 y 300 nM para REGN9534 pero ~2000 nM para COMP3059 (Tablas 9a-9c). El TP se mantuvo sin cambios y no alcanzó un tiempo de duplicación para ninguno de los mAb a dosis de hasta 600 nM.

[0169] Se evaluaron los efectos de los mAb anti-FXII/FXIIa en cuanto a su capacidad para inhibir la generación de trombina (es decir, tiempo prolongado hasta la detección de trombina = tiempo de retardo, reducción del pico de trombina y reducción de la cantidad total de trombina generada = potencial de trombina endógena) cuando el plasma era activado por ácido elálgico o factor tisular. En una mezcla de plasma humano normal «sano», ambos mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron requirieron al menos 125 nM de fármaco para comenzar a afectar la generación de trombina activada por ácido elálgico, pero a dosis de $\geq$ 250 nM, el mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron inhibió completamente la producción de trombina (tablas 10a-10f), lo que indica que los mAb de Regeneron suprimen la vía intrínseca de la coagulación que, a su vez, previene la generación de trombina en pasos posteriores. El COMP3059 mostró un efecto dependiente de la dosis en la generación de trombina con una inhibición casi completa a 500 nM. La

generación de trombina desencadenada por el factor tisular se vió mínimamente (<30 % de generación de trombina basal) afectada por los mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron o el COMP3059. Las concentraciones de la sustancia de prueba requeridas para duplicar el tiempo de latencia, reducir el pico de trombina y la cantidad total de generación de trombina a la mitad cuando la coagulación es activada por ácido elágico o factor tisular se resumen en las tablas 10a-f. En una mezcla de plasma de mono Cyno normal «sano», tanto los mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron como el COMP3059 fueron menos efectivos para inhibir la generación de trombina activada por ácido elágico, incluso a una dosis máxima que fue 10 veces mayor que la utilizada en plasma humano. Los REGN9533 y REGN9534 pudieron reducir la generación de trombina a ~60 % de la producción de trombina de referencia mientras que el COMP3059 redujo la generación de trombina al 50 % (tablas 11a-11f). Ninguno de los mAb anti-FXII/FXIIa tuvo un efecto perceptible en la generación de trombina activada por el factor tisular. Las concentraciones de anti-FXII/FXIIa requeridas para duplicar el tiempo de latencia, reducir el pico de trombina y la cantidad total de generación de trombina a la mitad cuando la coagulación es activada por ácido elágico o factor tisular en plasma de Cyno se resumen en las Tablas 11a-f. En una mezcla de plasma de ratón *F12^{hu/hu}* normal «sano», tanto los mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron como el COMP3059 fueron algo efectivos para inhibir la generación de trombina activada por ácido elágico a dosis de hasta 500 nM. Los REGN9533 y REGN9534 pudieron reducir la generación de trombina a ~25 % de la producción de trombina de referencia, respectivamente, mientras que el COMP3059 redujo la generación de trombina al ~ 30 % (tablas 12). Ninguno de los mAb anti-FXII/FXIIa tuvo un efecto perceptible en la generación de trombina activada por el factor tisular. Las concentraciones de anti-FXII/FXIIa requeridas para duplicar el tiempo de latencia, reducir el pico de trombina y la cantidad total de generación de trombina a la mitad cuando la coagulación es activada por ácido elágico o factor tisular en plasma de ratón *F12^{hu/hu}* se resumen en las tablas 12a-12f.

[0170] Se evaluó la capacidad de los mAb anti-FXII/FXIIa para afectar la fibrinólisis en un ensayo de turbidez que evalúa el tiempo de coagulación y el tiempo de lisis del coágulo. En presencia de X pM de factor tisular (TF), todos los mAb anti-FXII/FXIIa y el isotipo de control (REGN1945) generaron perfiles de coagulación similares, como lo indica un tiempo de formación del coágulo similar de 4 min (tabla 13), lo que indica que los mAb anti-FXII/FXIIa no afectan la coagulación mediada por la vía extrínseca. En presencia del activador tisular del plasminógeno (tPA 50 ng/mL), tras la coagulación inducida por TF, el REGN9533, el REGN9534 y el REGN1945 mostraron un tiempo de lisis del coágulo similar (es decir, una disminución en la señal óptica) de 120-125 min, mientras que el COMP3059 mostró un tiempo de lisis del coágulo ligeramente más largo de 144 min (tabla 13).

[0171] Los mAb también se evaluaron por su capacidad para inhibir la actividad de la calicreína plasmática mediada por el FXIIa, activada por sulfato de dextrano (DXS). En una mezcla de plasma humano normal «sano» activado con sulfato de dextrano (DXS), el REGN9533 y el REGN9534 inhibieron la actividad de la calicreína plasmática con una IC_{50} de aproximadamente 0,35 nM (Tabla 14). El REGN1945 no tuvo un efecto mientras que COMP3059 tuvo una IC_{50} de 0,49 nM. La tasa de inhibición de las concentraciones de mAb usadas se presentaron en la tabla 14. En una mezcla de plasma de Cyno normal «sano» activado con DXS, el REGN9533 y el REGN9534 fueron menos potentes que en el plasma humano para inhibir la actividad de la calicreína plasmática, con una IC_{50} de aproximadamente 1,5 y 2,5 nM, respectivamente (Tabla 15). El REGN1945 no tuvo un efecto mientras que COMP3059 tuvo una IC_{50} de 9,2 nM. La tasa de inhibición de las concentraciones de mAb usadas se presentaron en la tabla 15. En una mezcla de plasma de ratón *F12^{hu/hu};Serping1^{-/-}* normal activado con DXS, el REGN9533 y el REGN9534 fueron menos potentes que en el

plasma humano para inhibir la actividad de la calicreína plasmática, con una IC_{50} de aproximadamente 0,7 y 1,6 nM, respectivamente (tabla 16). El REGN1945 no tuvo un efecto mientras que COMP3059 tuvo una IC_{50} de 13,7 nM. La tasa de inhibición de las concentraciones de mAb usadas se presentaron en la tabla 16.

- 5 **[0172]** Los mAb anti-FXII/FXIIa de Regeneron, REGN9533 y REGN9534, son potentes para inhibir la actividad de la vía intrínseca de la coagulación (es decir, TTPa y TGA-EA), con mayor potencia en plasma humano que en plasma de mono Cyno o de ratón $F12^{hu/hu}$. No hay efecto sobre la actividad de la vía de coagulación extrínseca (PT y TGA-TF). Estos mAb no afectaron el tiempo de lisis del coágulo en presencia de tPA. Además, se determinó que el REGN9533 y
- 10 el REGN9534 son efectivos para inhibir la activación de la calicreína plasmática (es decir, la actividad de la calicreína plasmática) inducida por el sulfato de dextrano.

Tabla 7a: Tablas aPTT para el plasma humano con COMP3059

Tabla 1a: Tablas de PT para el plasma humano con C2xt 5000							
Conc. de mAb (nM)	COMP3059 en plasma humano						
	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	89,3	88,6	1 %	89,0	3,13	3,13	3,13
300	69,7	68,6	1 %	69,2	2,45	2,42	2,43
150	51,5	51,4	0 %	51,5	1,81	1,82	1,81
75	31,6	32,4	2 %	32,0	1,11	1,14	1,13
38	29,5	29,3	0 %	29,4	1,04	1,04	1,04
19	29,0	28,4	1 %	28,7	1,02	1,00	1,01
9	28,5	27,9	2 %	28,2	1,00	0,99	0,99
0	28,5	28,3	0 %	28,4	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) = 200		

15 Tabla 7b: Tablas aPTT para el plasma humano con REGN9533

Conc. de mAb (nM)	REGN9533 en plasma humano						
	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	223,0	162,0	22 %	192,5	7,29	5,09	6,19
300	205,1	149,0	22 %	177,1	6,70	4,69	5,69
150	77,0	65,8	11 %	71,4	2,52	2,07	2,29
75	32,0	30,6	3 %	31,3	1,05	0,96	1,00
38	31,9	33,8	4 %	32,9	1,04	1,06	1,05
19	31,4	32,8	3 %	32,1	1,03	1,03	1,03
9	30,9	33,1	5 %	32,0	1,01	1,04	1,03
0	30,6	31,8	3 %	31,2	1,00	1,00	1,00

Tabla 7c: Tablas aPTT para el plasma humano con REGN9534

Conc. de mAb (nM)	REGN9534 en plasma humano						
	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	236,1	173,9	21 %	205,0	8,11	5,78	6,95
300	144,9	113,1	17 %	129,0	4,98	3,76	4,37
150	47,0	38,3	14 %	42,7	1,62	1,27	1,44
75	31,7	30,5	3 %	31,1	1,09	1,01	1,05
38	30,2	29,3	2 %	29,8	1,04	0,97	1,01
19	28,2	29,5	3 %	28,9	0,97	0,98	0,97
9	28,4	29,8	3 %	29,1	0,98	0,99	0,98
0	29,1	30,1	2 %	29,6	1,00	1,00	1,00
	C2xt (nM) = 200						

Tabla 7d: Tablas PT para el plasma humano con COMP3059

Conc. de mAb (nM)	COMP3059 en plasma humano						
	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	14,4	14,7	1 %	14,4	1,01	1,04	1,02
300	14,3	14,4	0 %	14,3	1,00	1,02	1,01
150	14,3	14,4	0 %	14,3	1,00	1,02	1,01
0	14,3	14,1	1 %	14,3	1,00	1,00	1,00
	C2xt (nM) = N/A						

5 Tabla 7e: Tablas PT para el plasma humano con REGN9533

Conc. de mAb (nM)	REGN9533 en plasma humano						
	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	13,6	13,5	1 %	13,6	1,07	1,00	1,04
300	13,1	13,6	3 %	13,4	1,03	1,01	1,02
150	13,2	13,5	2 %	13,4	1,04	1,00	1,02
0	12,7	13,5	4 %	13,1	1,00	1,00	1,00
	C2xt (nM) = N/A						

Tabla 7f: Tablas PT para el plasma humano con REGN9534

Conc. de	REGN9534 en plasma humano
----------	---------------------------

<i>mAb (nM)</i>	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	14,4	14,2	1 %	14,3	1,01	1,01	1,01
300	14,2	14,2	0 %	14,2	0,99	1,01	1,00
150	14,1	14,1	0 %	14,1	0,99	1,00	0,99
0	14,3	14,1	1 %	14,2	1,00	1,00	1,00
					<i>C2xt (nM) = N/A</i>		

Tabla 8a: Tablas aPTT para el plasma de cyno con COMP3059

Conc. de mAb (nM)	COMP3059 en plasma de cyno						
	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	44,2	45,1	1 %	44,7	1,56	1,49	1,52
300	38,9	39,7	1 %	39,3	1,37	1,31	1,34
150	31,2	31,8	1 %	31,5	1,10	1,05	1,08
75	29,2	29,7	1 %	29,5	1,03	0,98	1,01
38	28,0	29,9	5 %	29,0	0,99	0,99	0,99
19	28,1	29,9	4 %	29,0	0,99	0,99	0,99
9	28,0	30,5	6 %	29,3	0,99	1,01	1,00
0	28,4	30,2	4 %	29,3	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) > 600		

Tabla 8b: Tablas aPTT para el plasma de cyno con REGN9533

Conc. de mAb (nM)	REGN9533 en plasma de cyno						
	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	90,1	95,0	4 %	92,6	3,11	3,25	3,18
300	81,5	84,7	3 %	83,1	2,81	2,90	2,86
150	43,5	50,5	11 %	47,0	1,50	1,73	1,61
75	29,2	29,3	0 %	29,3	1,01	1,00	1,01
38	28,7	29,3	1 %	29,0	0,99	1,00	1,00
19	28,6	29,2	1 %	28,9	0,99	1,00	0,99
9	28,6	29,1	1 %	28,9	0,99	1,00	0,99
0	29,0	29,2	0 %	29,1	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) = 250		

Tabla 8c: Tablas aPTT para el plasma de cyno con REGN9534

REGN9534 en plasma de cyno							
Conc. de mAb (nM)	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	54,0	55,5	2 %	54,8	1,85	1,98	1,92
300	46,5	47,3	1 %	46,9	1,59	1,69	1,64
150	37,1	37,2	0 %	37,2	1,27	1,33	1,30
75	28,6	29,2	1 %	28,9	0,98	1,04	1,01
38	28,6	28,0	1 %	28,3	0,98	1,00	0,99
19	28,5	27,8	2 %	28,2	0,98	0,99	0,98
9	28,5	27,8	2 %	28,2	0,98	0,99	0,98
0	29,2	28,0	3 %	28,6	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) > 600		

Tabla 8d: Tablas PT para el plasma de cyno con COMP3059

Conc. de mAb (nM)	COMP3059 en plasma de cyno						
	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	13,3	13,3	0 %	13,3	0,99	0,97	0,98
300	14,9	14,4	2 %	14,7	1,10	1,05	1,08
150	14,1	14,2	0 %	14,2	1,04	1,04	1,04
0	13,5	13,7	1 %	13,6	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) = N/A		

5 Tabla 8e: Tablas PT para el plasma de cyno con REGN9533

Conc. de mAb (nM)	REGN9533 en plasma de cyno						
	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	13,7	14,1	2 %	13,9	0,99	0,98	0,98
300	13,8	14,2	2 %	14,0	0,99	0,99	0,99
150	13,7	14,3	3 %	14,0	0,99	0,99	0,99
0	13,9	14,4	2 %	14,2	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) = N/A		

Tabla 8f: Tablas PT para el plasma de cyno con REGN9534

Conc. de	REGN9534 en plasma de cyno					
----------	----------------------------	--	--	--	--	--

<i>mAb (nM)</i>	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
600	14,4	14,1	1 %	14,3	1,03	1,01	1,02
300	14,0	14,4	2 %	14,2	1,00	1,03	1,01
150	14,2	14,1	0 %	14,2	1,01	1,01	1,01
0	14,0	14,0	0 %	14,0	1,00	1,00	1,00
					<i>C2xt (nM) = N/A</i>		

Tabla 9a: Tablas aPTT para el plasma *F12 hu/hu* con COMP3059

Conc. de mAb (nM)	COMP3059 en plasma F12 ^{hu/hu}						
	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
2400	65,5	68,7	3 %	67,1	1,84	1,93	1,89
1200	62,3	68,4	7 %	65,3	1,75	1,92	1,84
600	56,6	62,7	7 %	59,6	1,59	1,76	1,68
300	55,5	57,0	2 %	56,2	1,56	1,60	1,58
150	48,4	49,8	2 %	49,1	1,36	1,40	1,38
75	38,4	39,2	1 %	38,8	1,08	1,10	1,09
0	35,6	35,6	0 %	35,6	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) ~ 2000		

Tabla 9b: Tablas aPTT para el plasma *F12 hu/hu* con REGN9533

Conc. de mAb (nM)	REGN9533 en plasma F12 hu/hu						
	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
2400	84,5	79,3	4 %	81,9	2,46	2,35	2,41
1200	82,6	77,9	4 %	80,3	2,41	2,31	2,36
600	82,5	73,6	8 %	78,1	2,41	2,18	2,29
300	79,6	72,2	7 %	75,9	2,32	2,14	2,23
150	58,0	57,4	1 %	57,7	1,69	1,70	1,70
75	36,7	36,5	0 %	36,6	1,07	1,08	1,08
0	34,3	33,7	1 %	34,0	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) ~250		

Tabla 9c: Tablas aPTT para el plasma *F12 hu/hu* con REGN9534

<i>Conc. de</i>	REGN9534 en plasma <i>F12 hu/hu</i>					
-----------------	-------------------------------------	--	--	--	--	--

<i>mAb</i> (nM)	aPTT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio		Promedio
2400	80,1	83,0	3 %	81,6	2,25	2,33	2,29
1200	82,1	79,8	2 %	81,0	2,31	2,24	2,27
600	76,3	81,7	5 %	79,0	2,14	2,29	2,22
300	73,0	74,6	2 %	73,8	2,05	2,10	2,07
150	60,0	59,9	0 %	60,0	1,69	1,68	1,68
75	38,8	42,7	7 %	40,8	1,09	1,20	1,14
0	35,6	35,6	0 %	35,6	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) = 300		

Tabla 9d: Tablas PT para el plasma *F12^{hu/hu}* con COMP3059

Conc. de <i>mAb</i> (nM)	COMP3059 en plasma <i>F12^{hu/hu}</i>					
	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio	
2400	11,7	11,6	1 %	11,7	0,98	1,00
1200	12,2	11,6	4 %	11,9	1,02	1,00
600	11,9	11,5	2 %	11,7	0,99	0,99
300	12,0	11,9	1 %	12,0	1,00	1,03
0	12,0	11,6	2 %	11,8	1,00	1,00
					C2xt (nM) = N/A	

Tabla 9e: Tablas PT para el plasma *F12^{hu/hu}* con REGN9533

Conc. de <i>mAb</i> (nM)	REGN9533 en plasma <i>F12^{hu/hu}</i>					
	PT (Sec)		% CV	Promedio	Relación de cambio	
2400	11,6	11,6	0 %	11,6	1,01	1,00
1200	11,5	11,5	0 %	11,5	1,00	0,99
600	11,9	11,9	0 %	11,9	1,03	1,03
300	11,4	11,7	2 %	11,6	0,99	1,01
0	11,5	11,6	1 %	11,6	1,00	1,00
					C2xt (nM) = N/A	

Tabla 9f: Tablas PT para el plasma *F12^{hu/hu}* con REGN9534

Conc. de <i>mAb</i> (nM)	REGN9534 en plasma <i>F12^{hu/hu}</i>				
	PT (Sec)	% CV	Promedio	Relación de cambio	Promedio

2400	11,7	11,6	1 %	11,7	1,02	1,00	1,01
1200	11,4	11,7	2 %	11,6	0,99	1,01	1,00
600	11,3	11,6	2 %	11,5	0,98	1,00	0,99
300	11,7	11,5	1 %	11,6	1,02	0,99	1,00
0	11,5	11,6	1 %	11,6	1,00	1,00	1,00
					C2xt (nM) = N/A		

Tabla 10a: TGA-EA para el plasma humano con COMP3059

Nombre del grupo	Hu- PBS_EA	3059_16n M	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(min)	9,5	10,0	12,3	17,8	22,3	31,5	39,5
ETP_(nM•min)	1265,7	1300,2	1240,7	1126,5	1044,5	699,7	368,0
Pico_(nM)	343,8	317,1	291,4	234,7	157,4	61,1	25,1
ttPico_(min)	11,17	12	14,5	20,5	25,83	36,33	45,17
VelIndex_(nM/min)	206,29	158,55	135,2	88,02	45,03	12,66	4,42
StartTail_(min)	26,83	27,83	30,67	37,33	44,33	62,5	76,33

5 Tabla 10b: TGA-EA para el plasma humano con REGN9533

Nombre del grupo	Hu- PBS_EA	9533_16n M	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(min)	8,2	7,3	8,0	9,0	16,5	58,5	-1,0
ETP_(nM•min)	1310,1	1293,2	1289,0	1262,3	1088,7	107,3	-1,0
Pico_(nM)	347,5	353,6	344,1	318,8	204,1	9,8	-1,0
ttPico_(min)	10,17	9	9,67	11	19,5	64,33	-1
VelIndex_(nM/min)	173,76	212,17	206,45	159,4	68,04	1,68	-1
StartTail_(min)	26,17	24,83	25,33	26,5	36,17	78,67	-1

Tabla 10c: TGA-EA para el plasma humano con REGN9534

Nombre del grupo	Hu- PBS_EA	9534_16n M	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(min)	8,0	7,5	7,7	9,3	12,5	38,8	63,8
ETP_(nM•min)	1434,5	1486,3	1440,2	1455,6	1344,5	229,4	55,4
Pico_(nM)	392,4	408,5	386,4	388,2	321,6	16,0	6,4

ttPico_(min)	9,83	9,17	9,5	11,0	14,83	45,17	69,0
	215,53	245,12	212,4	232,9	137,8	2,51	1,2
VelIndex_(nM/min)			6	1	2		
StartTail_(min)	25,33	24,67	25,33	27,0	31,0	71,5	78,67

Tabla 10d: TGA-TF para el plasma humano con COMP3059

Nombre del grupo	Hu- PBS_TF	3059_16nM	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(min)	7,3	7,8	8,0	7,8	8,0	8,2	8,8
ETP_(nM•min)	552,6	537,9	518,4	541,1	495,6	495,5	416,2
Pico_(nM)	34,9	36,5	30,7	33,9	30,4	29,8	26,8
ttPico_(min)	14	14,33	15,33	14,83	15,17	15,17	15,67
VelIndex_(nM/min)	5,23	5,72	4,19	4,84	4,24	4,26	3,92
StartTail_(min)	47,5	44,83	52	50,5	50,17	50,67	49,33

Tabla 10e: TGA-TF para el plasma humano con REGN9533

Nombre del grupo	Hu- PBS_TF	R9533_16n M	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(mi n)	7,3	7,7	8,0	8,0	8,3	8,7	9,0
ETP_(nM•min)	552,6	569,7	488,8	485,7	499,9	456,5	411,6
Pico_(nM)	34,9	37,1	29,6	31,0	30,1	28,1	25,3
ttPico_(min)	14	14,17	15,33	15	15,67	15,67	16,33
VelIndex_(nM/min)	5,23	5,81	4,03	4,45	4,1	4,02	3,46
StartTail_(min)	47,5	48,67	49,33	48,83	51	48,67	49,5

5

Tabla 10f: TGA-TF para el plasma humano con REGN9534

Nombre del grupo	Hu- PBS_TF	R9534_16n M	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(mi n)	8,0	8,0	7,7	7,8	8,0	8,5	8,7
ETP_(nM•min)	482,1	468,2	538,6	537,9	469,2	479,9	433,5
Pico_(nM)	30,4	28,9	34,6	36,5	30,1	29,3	26,9
ttPico_(min)	15	15	14,5	14,33	15	15,5	15,67
VelIndex_(nM/min)	4,35	4,13	5,07	5,72	4,3	4,19	3,85
StartTail_(min)	48,33	48,33	47,5	44,83	48,33	50	48,5

Tabla 11a: TGA-EA para el plasma de cyno con COMP3059

Nombre del grupo	PBS EA de cyno	3059 160nM	310 nM	620 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM
Tiempolatencia_(min)	5	7,17	7,33	7,83	7,83	7,67	8,33
ETP_(nM•min)	2631,8	2438,61	2389,78	2259,61	2211,37	2148,77	2120,59

Pico_(nM)	396,83	290,45	273,64	255,31	240,32	218,49	205,24
ttPico_(min)	7,67	11	11,5	12	12,33	12,5	13,33
VelIndex_(nM/min)	148,81	75,96	65,82	61,31	53,44	45,26	41,05
StartTail_(min)	26	32,33	34	34,33	34,83	36,83	38,67

Tabla 11b: TGA-EA para el plasma de cyno con REGN9533

Nombre del grupo	PBS EA de cyno	9533 160nM	310 nM	620 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM
Tiempolatencia_(min)	5	6	6,5 2480,9	7,83	8	8,17	8,33
ETP_(nM•min)	2699,12	2556,99	2	2311,78	2157,57	2139,15	2147,64
Pico_(nM)	399,12	355,05	316,57	263,66	238,53	231,54	232,82
ttPico_(min)	8	9,33	10,17	12	12,5	12,83	12,83
VelIndex_(nM/min)	133,04	106,51	86,34	63,41	53,08	49,62	51,81
StartTail_(min)	27	27,17	31,17	33,5	35	36,67	36,67

Tabla 11c: TGA-EA para el plasma de cyno con REGN9534

Nombre del grupo	PBS EA de cyno	9534 160nM	310 nM	620 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM
Tiempolatencia_(min)	5,17	6	6,67	7	7,33	7,67	8
ETP_(nM•min)	2587,44	2491,13	2419,72	2328,87	2294,4	2242,57	2221,59
Pico_(nM)	390,77	344,94	316,48	289,15	270,31	257,63	248,56
ttPico_(min)	8	9,33	10,17	10,83	11,33	12	12,33
VelIndex_(nM/min)	138,42	103,48	90,61	75,56	67,58	59,45	57,36
StartTail_(min)	26,33	28,33	29,5	31,83	33,17	33,17	34,5

5

Tabla 11d: TGA-TF para el plasma de cyno con COMP3059

Nombre del grupo	PBS TF de cyno	3059 160nM	310 nM	620 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM
Tiempolatencia_(min)	3,83	4	4	4	4,17	4,33	4,33
ETP_(nM•min)	1732,29	1637,49	1563,48	1693,15	1567,14	1581,82	1650,9
Pico_(nM)	178,77	164,31	156,52	170,56	157,46	153,77	154,77
ttPico_(min)	9,17	9,67	9,5	9,5	9,83	10	10,33
VelIndex_(nM/min)	33,79	29	28,49	31,1	27,79	27,14	25,79
StartTail_(min)	32,67	32,33	32	35,33	33	34	34,5

Tabla 11e: TGA-TF para el plasma de cyno con REGN9533

Nombre del grupo	PBS TF de cyno	9533 160nM	310 nM	620 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM
Tiempolatencia_(min)	4	4	4	4	4	4	4

			1505,5				
ETP_(nM•min)	1562,68	1521,56	5	1691,39	1470,79	1564,61	1603,64
Pico_(nM)	157,87	154,36	153,75	165,85	152,68	160,27	164,09
ttPico_(min)	9,33	9,5	9,67	9,67	9,33	9,5	9,5
VelIndex_(nM/min)	29,6	28,1	27,13	29,27	28,63	29,16	29,88
StartTail_(min)	32,17	32	31,33	33,17	31,33	31,5	31,5

Tabla 11f: TGA-TF para el plasma de cyno con REGN9534

Nombre del grupo	PBS TF de cyno	9534 160nM	310 nM	620 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM
Tiempolatencia_(min)	4	4	4	4	4	4	4,33
ETP_(nM•min)	1512,52	1548,55	1578,12	1561,12	1544,93	1589,81	1725,56
Pico_(nM)	151,49	154,94	159,45	157,62	155,51	161,7	170,48
ttPico_(min)	9,67	9,5	9,33	9,33	9,67	9,67	9,67
VelIndex_(nM/min)	26,73	28,21	29,9	29,55	27,44	28,54	31,97
StartTail_(min)	33	33	32,83	32,83	32,33	32,83	33

Tabla 12a: TGA-EA para ratones *F12^{hu/hu}* con COMP3059

Nombre del grupo	F12 hu/hu ratones_E A	3059_16 nM	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(min)	4,3	4,0	4,0	4,3	5,0	5,5	6,0
ETP_(nM•min)	818,9	696,4	687,1	703,9	609,5	519,7	368,2
Pico_(nM)	61,0	52,7	49,7	45,3	36,1	29,5	20,6
ttPico_(min)	7,5	7,17	7,33	8,17	9,67	10,67	12,33
VelIndex_(nM/min)	19,32	16,73	14,92	11,84	7,74	5,71	3,26
StartTail_(min)	49,83	49,33	49,33	52,17	54,33	54,17	51

5

Tabla 12b: TGA-EA para ratones *F12^{hu/hu}* con REGN9533

Nombre del grupo	F12 hu/hu ratones_E A	REGN9533_16 nM	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(min)	4,3	4,3	4,3	4,3	5,2	6,5	7,0
ETP_(nM•min)	818,9	712,0	702,4	694,8	536,6	356,4	281,2
Pico_(nM)	61,0	44,9	44,7	44,4	31,6	17,8	13,8
ttPico_(min)	7,5	8,17	8,17	8	9,67	13,5	15,17
VelIndex_(nM/min)	19,32	11,76	11,71	12,12	7,05	2,54	1,7
StartTail_(min)	49,83	53,67	54,33	54,3	54	58,83	54,17

Tabla 12c: TGA-EA para ratones *F12^{hu/hu}* con REGN9534

Nombre del grupo	F12 hu/hu ratones_E	R9534_16 nM	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
A							
Tiempolatencia_(min)	4,33	4,5	4,67	4,67	5,17	6,17	7
ETP_(nM•min)	818,94	705,95	630,23	709,39	580,83	420,1	328,7
Pico_(nM)	60,95	42,6	39,55	38,54	35,67	21,45	15,52
ttPico_(min)	7,5	8,83	9	9,33	9,5	12,5	15,5
VellIndex_(nM/min)	19,32	9,83	9,18	8,26	8,23	3,39	1,83
StartTail_(min)	49,83	54,5	47,33	59,83	53,5	59,33	57,5

Tabla 12d: TGA-TF para ratones *F12^{hu/hu}* con COMP3059

Nombre del grupo	F12 hu/hu ratones_T	Comp3059_1 6 nM	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
F							
Tiempolatencia_(min)	2,24	2,24	2,24	2,24	2,24	2,41	2,58
ETP_(nM•min)	628,48	644,34	615,89	587,79	614,34	628,59	599,57
Pico_(nM)	46,78	46,61	46,3	46,15	46,73	46,29	45,96
ttPico_(min)	5,76	5,59	5,42	5,59	5,59	5,76	5,76
VellIndex_(nM/min)	13,37	13,94	14,63	13,8	13,98	13,84	14,52
StartTail_(min)	50,89	50,89	48,89	45,38	49,39	51,06	48,39

5

Tabla 12e: TGA-TF para ratones *F12^{hu/hu}* con REGN9533

Nombre del grupo	F12 hu/hu ratones_TF	R9533_16 nM	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM
Tiempolatencia_(min)	2,24	2,24	2,24	1,91	2,41	2,58	2,58
ETP_(nM•min)	620,28	579,14	587,86	577,19	592,09	599	604,47
Pico_(nM)	46	45,62	45,49	44,55	46,02	44,54	45,34
ttPico_(min)	5,59	5,59	5,42	5,59	5,59	5,92	5,76
VellIndex_(nM/min)	13,76	13,65	14,36	12,2	14,53	13,32	14,31
StartTail_(min)	52,06	46,55	50,39	46,21	47,05	49,39	46,88

Tabla 12f: TGA-TF para ratones *F12^{hu/hu}* con REGN9534

Nombre del grupo	F12 hu/hu ratones_T	R9534_16 nM	31 nM	62 nM	125 nM	250 nM	500 nM

F							
TiempoLatencia_(min)	2,24	2,24	2,24	2,24	1,91	2,58	2,58
ETP_(nM•min)	569,08	625,47	587,64	581,85	577,19	587,13	603,43
Pico_(nM)	47,24	47,27	46,22	45,18	44,55	45,55	45,38
ttPico_(min)	5,42	5,42	5,42	5,59	5,59	5,76	5,76
VelIndex_(nM/min)	14,93	14,94	14,61	13,51	12,2	14,38	14,33
StartTail_(min)	45,04	49,39	44,87	45,38	46,21	47,05	49,39

Tabla 13: Formación de coágulos inducida por el factor tisular (TF) y tiempo de lisis del coágulo mediada por tPA en plasma humano

L7023 Humano	Tiempo de formación de coágulos		Tiempo de lisis de coágulos-TF	
mAb REGN#	min	Veces	min	Veces
REGN1945-L49	4	1,0	120	1,0
COMP3059-L2	4	1,0	144	1,2
REGN9533-L2	4	1,0	125	1,0
REGN9534-L2	4	1,0	125	1,0

5 Tabla 14: Actividad de la calicreína plasmática en plasma humano

Concentración (M)	REGN1945 (V _{máx} /min)		COMP3059 (V _{máx} /min)		REGN9533 (V _{máx} /min)		REGN9534 (V _{máx} /min)	
1e-010	2,584	2,83	2,925	2,43	2,031	2,137	2,203	2,565
1,5e-010	2,623	2,555	2,316	2,243	1,658	1,399	2,017	
3,1e-010	2,558	2,598	1,932	2,137	1,321		1,125	1,781
6,2e-010	2,611	2,336	0,697	1,175	0,854	0,813	0,591	0,682
1,25e-009	2,444	2,373	0,491	0,232	0,094	0,116	0,102	0,1
2,5e-009	2,485	2,796	0,069	0,061	0,098		0,039	0,068
5e-009	2,313	2,358	0,031	0,083	0,07	0,081	0,063	0,062
1e-008	2,671	2,462	0,032	0,069	0,146	0	0,054	

Tabla 15: Actividad de la calicreína plasmática en plasma de cyno

Concentración (M)	REGN1945 (V _{máx} /min)		COMP3059 (V _{máx} /min)		REGN9533 (V _{máx} /min)		REGN9534 (V _{máx} /min)	
1e-010	9,262	8,789	10,057	9,397	10,148	9,277	9,569	9,415
3e-010	9,717	8,91	9,629	9,306	9,13	8,567	8,92	8,542
6,2e-010	9,787	9,221	9,315	9,3	8,523	8,022	8,684	8,489
1,25e-009	9,492	9,683	9,632	9,102	6,304		7,256	7,36
2,5e-009	8,811	9,238	8,26	7,984	0,403	0,236	4,654	4,828
5e-009	9,123	8,631	6,831	6,603	0,165	0,244	1,246	1,592
1e-008	9,271	8,242	5,571	4,125	0,237	0,459	0,202	0,554
2e-008	8,728	7,92	2,787	1,485	0,125	0,263	0,463	0,27

Tabla 16: Actividad de la calicreína plasmática en plasma de ratones $F12^{hu/hu}$; $Serping1^{-/-}$

Concentración (M)	REGN1945 ($V_{m\acute{a}x}/min$)		COMP3059 ($V_{m\acute{a}x}/min$)		REGN9533 ($V_{m\acute{a}x}/min$)		REGN9534 ($V_{m\acute{a}x}/min$)	
1e-010	2,349	2,431	2,418	2,543	2,385	2,408	2,332	2,356
1,5e-010	2,294	2,292	2,408	2,488	2,167	2,268	2,315	
3,1e-010		2,318	2,442	2,437	2,036	2,19	2,858	2,298
6,2e-010	2,282	2,264	2,41	2,396	1,519	1,556	2,146	2,213
1,25e-009	2,15	2,179	2,412	3,666	0,134	0,148	1,613	
2,5e-009	1,95	2,208	2,127	2,189	0,118	0,143	0,514	0,672
5e-009	2,357	2,217	1,816	1,883	0,206		0,186	0,203
1e-008	2,217	2,22		1,723		0,104		0,124

[0173] Los resultados anteriores muestran que los anticuerpos ejemplificados inhiben la generación de trombina mediante la vía intrínseca sin inhibir la vía extrínseca.

Ejemplo 6: Generación de variantes YTE de anticuerpos monoclonales anti-FXII

[0174] Se generaron variantes Fc de los anticuerpos monoclonales anti-hFXII/FXIIa mediante mutaciones de los residuos 252, 254 y 256 en el dominio Fc a los residuos Y, T y E, respectivamente (variantes «YTE»). El anticuerpo parental REGN9533 fue modificado de esta manera para producir una variante YTE de ejemplo: REGN17653.

[0175] La tabla 17a presenta los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, las CDR y la región constante de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos anti-FXII variantes YTE seleccionados de la presente descripción.

Tabla 17a: Identificadores de secuencias de aminoácidos

	SEQ ID NO:									
Designación de anticuerpo	HCVR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC	LC
REGN17653	2	4	6	8	10	12	14	16	40	20

[0176] Los identificadores de secuencias de ácidos nucleicos correspondientes se establecen en la tabla 17b.

Tabla 17b: Identificadores de secuencias de ácido nucleico

	SEQ ID NO:									
Designación de anticuerpo	HCVR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC	LC
REGN17653	1	3	5	7	9	11	13	15	39	19

Ejemplo 7: Validación del modelo de ratón $FcRn^{hu/hu}$ $B2m^{hu/hu}$ para comparar las vidas medias de la variante YTE y los anticuerpos parentales

[0177] Se evaluó la idoneidad de los ratones $FcRn^{hu/hu}$ $B2m^{hu/hu}$ como modelos in vivo para

medir las diferencias en la vida media de los anticuerpos variantes YTE en comparación con los anticuerpos parentales. En estos experimentos, se administró una dosis intravenosa única de 10 mg/kg del anticuerpo parental anti-SARS-CoV2 (REGN10933, isotipo hIgG1) o de su variante YTE (REGN13213, isotipo hIgG1) a ratones hIgHC-KC (het) x FcRn^{hu/hu} B2M^{hu/hu} x F12^{hu/hu}. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-Fel D1 (isotipo hIgG4) como control. La recolección de muestras de suero sanguíneo se realizó los días 0 (2 horas después de la dosis), 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 30, 45 y 60 después de la dosis. Se dosificaron 4 ratones en cada grupo de prueba y 6 ratones en el grupo de control. Las concentraciones totales de anticuerpo dosificado en el plasma sanguíneo se midieron mediante el inmunoensayo GYROLAB®, determinando las concentraciones de fármaco en plasma tras una disociación ácida. No se utilizó disociación ácida para el anticuerpo de control. Para facilitar la captura de anticuerpos, se utilizaron mAb (anticuerpos monoclonales) anti-idiotipo SARS-CoV2 conjugados con biotina o mAb Fel-D1 conjugado con biotina, y se detectaron mediante un mAb de ratón anti-IgG1/IgG4 humano conjugado con Alexa 647. Las concentraciones de anticuerpo en las muestras de plasma se determinaron a lo largo de 45 días y se calcularon los parámetros farmacocinéticos (PK).

[0178] Para la cuantificación de las concentraciones de anticuerpos, el límite inferior de cuantificación (LLOQ) para los anticuerpos SARS-CoV2 se estableció en 0,05 µg/ml. Para el cálculo de las concentraciones promedio, si más del 50 % de los valores estaban por debajo del límite de cuantificación (BLQ), el promedio se reportó como BLQ; mientras que, si el 50 % o menos de los valores eran BLQ, los promedios se calcularon sustituyendo los BLQ por 0. El promedio calculado se reportó si era superior al LLOQ, mientras que el promedio se reportó como BLQ si el resultado del cálculo era inferior o igual al LLOQ. Las concentraciones de anticuerpo se calcularon a partir de las mediciones del inmunoensayo y se presentan en las tablas 18a-18b.

[0179] Los parámetros PK se calcularon a partir de las mediciones de concentración de los mAb (tabla 18c) y confirmaron que el mAb variante SARS-CoV2-YTE (REGN13213) presentaba una vida media prolongada en comparación con el mAb parental SARS-CoV2 (REGN10933). Estas observaciones validaron el uso del modelo de ratón FcRn^{hu/hu} B2M^{hu/hu} para medir diferencias en los parámetros PK de las variantes YTE y los anticuerpos parentales. Tabla 18a: Concentraciones totales de mAb parental SARS-CoV2 (REGN10933)

Punto de tiempo	21	22	23	24	PROM	SEM
2 horas	440,3	598,5	387,1	544,2	492,5	48,1
Día 1	301,6	393,6	842,5	301,6	459,8	129,4
Día 2	206,9	293,2	287,8	283,0	267,7	20,4
Día 3	134,5	188,8	269,4	217,7	202,6	28,2
Día 4	111,1	129,0	174,1	192,3	151,6	19,0
Día 7	70,1	74,2	116,3	101,8	90,6	11,1
Día 14	22,7	22,0	35,6	55,9	34,0	7,9
Día 21	8,6	6,5	14,6	14,2	11,0	2,0
Día 30	1,3	0,6	5,2	6,9	3,5	1,5
Día 45	BLQ	0,1	1,1	0,7	0,5	0,3

Tabla 18b: Concentraciones totales de mAb variante SARS-CoV2-YTE (REGN13213)

Punto de tiempo	18	19	20	28	PROM	SEM
2 horas	214,7	123,3	235,7	301,3	218,7	36,8
Día 1	109,3	186,0	161,7	470,9	232,0	81,2
Día 2	133,3	93,0	205,5	115,6	136,8	24,3
Día 3	142,4	111,5	291,2	124,1	167,3	41,8
Día 4	103,0	56,4	225,6	139,4	131,1	35,8
Día 7	56,6	67,6	119,6	83,7	81,9	13,8
Día 14	27,9	34,4	78,4	87,5	57,1	15,1
Día 21	6,8	7,0	72,3	134,4	55,1	30,6
Día 30	BLQ	0,2	35,2	86,7	30,5	20,5
Día 45	BLQ	0,1	10,4	39,4	12,5	9,3

Tabla 18c: Parámetros PK de anticuerpos variante YTE y parental anti- SARS-CoV2 en ratones FcRn^{hu/hu} B2m^{hu/hu}

Tratamiento	T $\frac{1}{2}$ (días)	T _{máx} (días)	C _{máx} (µg/mL)	Último AUC (día x µg/ml)	Eliminación (ml/día/kg)
mAb parental SARS-CoV2 (REGN10933)	9,8±3,9	1,3±0,6	291±64	2600±840	5,2±1,7
mAb variante SARS-CoV2-YTE (REGN13213)	4,7±0,7	0,3±0,2	606±85	2300±290	4,6±0,6
Anti-Fel D1 (REGN1945)	5,1±0,9	0,08±0	119±4,1	759±87	14±0,9

Ejemplo 8: Comparación de perfiles de PK de REGN17653 y REGN9533

[0180] Tras haber validado el modelo de ratón FcRn^{hu/hu} B2m^{hu/hu} como un modelo para evaluar la extensión de la vida media de los anticuerpos con variante YTE, se evaluó el perfil farmacocinético (PK) de un anticuerpo monoclonal anti-hFXII/FXIIa, REGN9533, y su variante con mutación Fc (para la extensión de la vida media), REGN17653, en comparación con un control de isotipo IgG4^P, REGN1945. Estos experimentos se realizaron en ratones humanizados para F12, FcRn, B2m y que expresan IgG totalmente humana, con el fin de inducir tolerización y reducir las respuestas de anticuerpos antifármaco (ADA). Las cohortes contenían de 6 a 8 ratones por anticuerpo analizado. Los ratones dosificados con REGN9533, REGN17653 y REGN1945 recibieron una dosis única intravenosa (IV) de 10 mg/kg. Se recolectaron muestras de sangre a las 2 horas y a los 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 30 y 45 días después de la dosificación. La sangre se procesó para obtener plasma y se congeló a -80 °C hasta su análisis. Las concentraciones séricas funcionales de REGN9533, REGN17653 y REGN1945

se midieron utilizando la plataforma GyroLab xPlore (Gyros).

[0181] La tecnología Gyros utiliza un formato de flujo continuo por afinidad para inmunoensayos automatizados con detección de fluorescencia inducida por láser. Las muestras se cargan en un disco compacto (CD) que contiene múltiples columnas de captura por afinidad a escala de nanolitros dispuestas radialmente. El flujo de líquido se controla mediante fuerzas centrífugas y capilares.

[0182] Para la medición de REGN9533 y REGN17653 funcionales en plasma, se realizó un paso de disociación ácida para asegurar que los anticuerpos no estuvieran formando complejos con el FXII soluble. Este paso de disociación ácida no fue necesario para REGN1945. Tras el paso de disociación ácida, se añadieron 20 µg/mL de un reactivo de captura biotinilado específico para el artículo de prueba o el artículo de control (mAb anti-REGN9533, REGN19721: para REGN9533 y REGN17653; o Fel D1.mmH, REGN612: para REGN1945) en un CD Gyrolab Bioaffy 200 que contenía columnas de afinidad precargadas con perlas recubiertas de estreptavidina (Dynospheres). Los estándares utilizados para la calibración (REGN9533, REGN17653) se procesaron en concentraciones que oscilaron entre 0,3 y 1300 ng/mL, o entre 0,5 y 2000 ng/mL para REGN1945. Los estándares o muestras se prepararon en Tris-HCl 1M que contenía plasma normal de ratón (REGN9533, REGN17653) o en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 %, que contenía plasma normal de ratón (REGN1945). Se agregaron singletes de muestras de plasma diluidas a 1:3020 (REGN9533, REGN17653) o 1:2000 (REGN1945) y duplicados de los estándares en las columnas de afinidad recubiertas con el reactivo de captura a temperatura ambiente. El anticuerpo capturado se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-hIgG4 humana específico conjugado con Alexa-647 (REGN1298 a 4 µg/mL) diluido en tampón Rxxip F (Gyros); la señal fluorescente resultante se registró en unidades de respuesta (RU) mediante el instrumento GyroLab xPlore. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) del ensayo respectivo se definió como la concentración más baja de la curva estándar multiplicada por el factor de dilución de la muestra (1 µg/mL). Las concentraciones de las muestras se determinaron por interpolación a partir de una curva estándar construida mediante un ajuste de curva logística de 4 parámetros en el software Gyrolab Evaluator. Se utilizaron las concentraciones promedio de 2 experimentos replicados para calcular las concentraciones finales. Este ensayo no diferencia entre hFXII/FXIIa unido frente al no unido, y no detecta hFXIIb. Las concentraciones de anticuerpos se evaluaron durante 45 días y se determinaron los parámetros farmacocinéticos (PK). No se analizaron las muestras del día 60 dado que las concentraciones del mAb parental eran indetectables para el día 45.

[0183] Para la cuantificación de las concentraciones de proteínas y anticuerpos, el límite inferior de cuantificación (LLOQ) para los anticuerpos anti-hFXII/FXIIa y de control de isotipo se estableció en 1 µg/ml, y el LLOQ para los niveles de hFXII/FXIIa se estableció en 0,2 µg/ml. La concentración basal de proteína se determinó en 11,8 µg/ml a partir de muestras de sangrado previo. Para el cálculo de las concentraciones promedio, si más del 50% de los valores estaban por debajo del límite de cuantificación (BLQ), el promedio se reportó como BLQ; mientras que, si el 50% o menos de los valores eran BLQ, los promedios se calcularon sustituyendo los BLQ por 0. El promedio calculado se reportó si era superior al LLOQ, mientras que el promedio se reportó como BLQ si el resultado del cálculo era inferior o igual al LLOQ. El promedio calculado se reportó si era superior al LLOQ, mientras que el promedio se reportó como BLQ si el resultado del cálculo era inferior o igual al LLOQ. Las FIG. 1A-1C muestran la evolución temporal de las concentraciones de mAb y las concentraciones de hFXII/FXIIa medidas para cada ratón individual en los 3 grupos de tratamiento durante el transcurso de este estudio. Las concentraciones promedio se calcularon a partir de estas mediciones para

cada grupo de tratamiento y se enumeran en función del tiempo en las tablas 19a-19f.

[0184] Las concentraciones promedio calculadas revelan que las concentraciones del anticuerpo REGN17653 disminuyeron de forma constante a lo largo del tiempo de manera lineal hasta el día 30. Después del día 30, 5 de los 6 ratones del grupo de control de isotipo y 6 de los 7 ratones del grupo REGN17653 mostraron una depuración rápida, lo que resultó en que la mayoría de los ratones presentaran niveles BLQ al día 45, aunque un ratón de cada grupo de tratamiento tuvo una concentración de mAb mensurable al día 45.

[0185] Las concentraciones promedio de la proteína FXII/FXIIa muestran que las concentraciones máximas de hFXII/FXIIa total aumentaron 20 veces respecto al valor basal al día 7 para REGN17653 (mAb anti-hFXII/FXIIa-YTE), en comparación con un aumento de 7 veces al día 3 para REGN9533 (mAb anti-hFXII/FXIIa parental). El control de isotipo mostró un aumento inicial de aproximadamente 3 veces sobre el valor basal y las concentraciones se mantuvieron alrededor de ese nivel durante todo el estudio. Se observó que las concentraciones de hFXII/FXIIa regresaron a niveles similares a los del control de isotipo después del día 21 para REGN17653 y después del día 7 para REGN9533.

[0186] A continuación, se calcularon las concentraciones de anticuerpo correspondientes a los niveles máximos de hFXII/FXIIa para cada grupo de tratamiento, las cuales se enumeran en la tabla 20. Aquí, las concentraciones de anticuerpos se convirtieron a unidades nM basándose en el peso molecular del FXII de 80 kDa, donde el nivel basal de anticuerpo de 11,8 µg/ml corresponde a una concentración de 133 nM. Los datos revelan que la concentración promedio del REGN9533 parental fue de 536 nM en los niveles máximos de hFXII/FXIIa de 953 nM el día 3, mientras que la concentración de la variante YTE REGN17653 fue de 528 nM en los niveles máximos de hFXII/FXIIa de 2559 nM el día 7.

[0187] Finalmente, los parámetros farmacocinéticos (PK) se calcularon a partir de las mediciones de concentración de mAb para cada grupo de tratamiento y se enumeran en la tabla 21. Una comparación de los perfiles PK reveló que la variante YTE REGN17653 exhibe una vida media más larga, una mayor exposición al fármaco y una tasa de depuración más lenta en comparación con su mAb parental REGN9533 y el mAb de control.

[0188] En conjunto, los estudios en ratones revelan que una variante YTE de un anticuerpo monoclonal anti-hFXII/FXIIa tiene una vida media prolongada en comparación con el anticuerpo parental.

Tabla 19a: Concentraciones totales de mAb parental anti-hFXII/FXIIa (REGN9533)

Punto de tiempo	1	2	3	4	5	6	25	26	PROM	SEM
2 horas	144,4	199,3	157,3	129,7	148,5	181,2	184,9	184,4	166,2	8,7
Día 1	94,3	85,3	145,0	94,4	115,4	132,6	122,5	71,6	107,6	8,9
Día 2	76,6	49,9	130,4	74,7	94,6	121,8	100,8	101,9	93,9	9,3
Día 3	58,1	23,9	122,9	65,7	83,1	105,9	99,0	85,5	80,5	11,0
Día 4	46,3	9,4	100,6	47,0	61,3	81,9	76,3	64,1	60,9	9,7
Día 7	16,9	BLQ	54,4	19,0	35,5	34,4	45,9	37,6	30,5	6,2
Día 14	1,3	BLQ	10,3	2,0	5,1	7,1	N/S	8,8	4,9	1,5

Día 21	BLQ	BLQ	2,6	BLQ	1,1	1,5	1,7	1,4	1,0	0,3
Día 30	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Día 45	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

Tabla 19b: Concentraciones totales de mAb variante YTE anti-hFXII/FXIIa (REGN17653)

Punto de tiempo	7	8	9	10	11	12	29	30	PROM	SEM
2 horas	207,8	234,3	182,6	216,9	269,3	176,8	178,2	206,4	209,0	11,2
Día 1	159,8	193,1	152,8	123,7	198,0	165,1	120,5	109,3	152,8	11,7
Día 2	124,4	152,4	153,7	132,7	181,3	139,8	118,7	104,0	138,4	8,5
Día 3	77,9	155,8	116,6	115,4	168,9	79,8	115,5	105,4	116,9	11,4
Día 4	58,5	133,5	101,1	93,0	151,1	112,9	88,1	77,9	102,0	10,6
Día 7	46,6	93,2	71,8	75,7	121,6	94,9	63,4	67,0	79,3	8,2
Día 14	9,5	21,5	30,5	19,7	37,2	29,4	22,1	25,9	24,5	2,9
Día 21	2,5	10,3	9,7	5,4	11,0	8,4	10,2	10,1	8,5	1,0
Día 30	BLQ	3,7	3,3	1,3	5,1	5,1	4,5	3,5	3,3	0,6
Día 45	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1,1	BLQ	1,2	BLQ	BLQ	BLQ

Tabla 19c: Concentraciones totales de mAb de control D1 anti-Fel REGN1945)

Punto de tiempo	13	14	15	16	17	27	PROM	SEM
2 horas	116,1	123,2	124,5	100,7	123,7	128,7	119,5	4,1
Día 1	88,3	94,0	77,7	83,6	87,0	73,9	84,1	3,0
Día 2	63,9	84,9	78,6	66,9	87,9	77,9	76,7	3,9
Día 3	43,9	76,3	69,1	56,9	72,2	62,4	63,5	4,8
Día 4	36,8	67,3	54,7	52,0	48,7	51,1	51,8	4,0
Día 7	19,9	43,5	41,8	38,6	38,5	42,8	37,5	3,6
Día 14	2,9	18,3	14,4	12,7	11,9	N/S	12,0	2,5
Día 21	BLQ	7,4	5,4	4,5	5,1	18,0	6,7	2,5
Día 30	BLQ	2,8	1,6	1,5	1,2	9,6	2,8	1,4
Día 45	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2,3	BLQ	BLQ

5

Tabla 19d: Concentraciones totales de hFXII/FXIIa en el grupo de tratamiento de mAb parental anti-hFXII/FXIIa (REGN9533)

Punto	1	2	3	4	5	6	25	26	PROM	SEM
-------	---	---	---	---	---	---	----	----	-------------	------------

de tiempo										
Valor inicial	9,2	13,5	5,3	13,7	12,8	9,2	12,3	13	11,1	1,0
2 horas	26,8	23,2	24,0	21,6	24,5	23,7	21,8	27,3	24,1	0,7
Día 1	60,1	52,5	49,0	72,5	56,4	44,5	47,1	49,7	54,0	3,2
Día 2	62,2	42,6	56,4	53,7	63,5	57,6	43,4	71,9	56,4	3,5
Día 3	74,1	41,2	72,1	74,7	83,1	N/S	95,0	93,9	76,3	6,8
Día 4	68,7	34,1	80,0	70,0	78,3	78,3	75,4	97,6	72,8	6,3
Día 7	46,2	27,2	81,7	44,8	68,4	N/S	74,5	79,0	60,3	7,9
Día 14	28,9	25,4	33,9	23,4	35,6	31,2	24,7	35,9	29,9	1,8
Día 21	18,1	27,5	24,8	20,1	29,0	36,7	27,0	30,9	26,8	2,1
Día 30	47,0	26,6	29,8	22,7	30,2	24,5	29,0	34,2	30,5	2,7
Día 45	21,2	22,7	23,9	20,2	20,4	22,4	23,3	25,6	22,5	0,7

Tabla 19e: Concentraciones totales de hFXII/FXIIa en el grupo de tratamiento de mAb variante YTE anti-hFXII/FXIIa (REGN17653)

Punto de tiempo	7	8	9	10	11	12	29	30	PROM	SEM
Valor inicial	7	15,5	13	12	9,8	7,8	0,9	13,3	9,9	1,6
2 horas	21,2	21,9	21,6	22,0	30,9	22,6	21,4	19,8	22,7	1,2
Día 1	71,5	204,3	46,8	48,9	50,7	43,6	62,3	83,9	76,5	18,9
Día 2	64,6	60,4	45,2	55,1	69,5	62,0	67,0	58,4	60,3	2,7
Día 3	61,8	76,0	N/S	92,8	77,3	N/S	162,3	71,8	90,3	15,0
Día 4	83,0	116,9	93,1	69,4	103,3	76,4	106,1	74,7	90,4	6,1
Día 7	89,5	770,3	N/S	123,5	117,0	106,8	96,6	129,6	204,7	94,4
Día 14	N/S	N/S	49,2	56,1	69,7	75,6	48,8	82,1	63,6	5,8
Día 21	33,6	34,1	34,7	43,0	53,1	68,7	42,9	55,8	45,7	4,4
Día 30	31,3	38,7	29,7	30,5	38,6	40,1	38,2	22,9	33,8	2,2
Día 45	30,5	20,6	18,2	13,6	17,9	16,4	34,7	23,9	22,0	2,6

5 Tabla 19f: Concentraciones totales de hFXII/FXIIa en el grupo de mAb de control D1 anti-Fel (REGN1945)

Punto de tiempo	13	14	15	16	17	27	PROM	SEM
-----------------	----	----	----	----	----	----	-------------	------------

Valor inicial	10,3	11,6	12,1	10,7	8,5	13,7	11,2	0,7
2 horas	21,7	31,6	25,0	28,1	30,7	22,9	26,7	1,7
Día 1	24,1	26,8	24,9	27,8	42,4	36,1	30,3	3,0
Día 2	29,8	40,0	35,0	36,1	39,4	35,7	36,0	1,5
Día 3	25,9	N/2	25,2	33,3	25,4	20,6	26,1	2,0
Día 4	25,4	27,7	26,8	25,5	29,5	25,9	26,8	0,6
Día 7	24,2	23,6	24,0	20,6	22,8	20,7	22,7	0,7
Día 14	21,5	28,6	N/S	20,6	21,0	43,1	27,0	4,3
Día 21	20,1	19,2	N/S	29,0	21,7	19,8	22,0	1,8
Día 30	21,1	29,7	19,9	23,1	27,0	33,2	25,7	2,1
Día 45	17,5	21,7	19,6	19,1	18,1	18,4	19,1	0,6

Tabla 20: Concentraciones molares promedio de mAb anti-hFXII/FXIIa y control de isotipo con concentraciones correspondientes de hFXII/FXIIa en ratones hlgHC-KC (het) x FcRnh^{u/hu} B2m^{hu/hu} x F12^{hu/hu}

Tratamiento	Punto de tiempo (días)	Conc. De hFXII/FXIIa pico (nM)	Conc. de mAb (nM)
mAb parental - anti-hFXII/FXIIa (REGN9533)	3	953	536
mAb variante YTE - anti-hFXII/FXIIa (REGN17653)	7	2559	528
Anti-Fel D1 (REGN1945)	1	379	560

5

Tabla 21: Parámetros PK de mAb REGN17653 y REGN9533 en hlgHC-KC (het) x ratones FcRnh^{u/hu} B2m^{hu/hu} x F12^{hu/hu}

Tratamiento	T1/2 (días)	Tmáx (día)	Cmáx (ug/mL)	AUClast (último*ug/mL)	Eliminación (mL/día/kg)
mAb parental - anti-hFXII/FXIIa (REGN9533)	2,6 ± 0,3	0,08 ± 0	166 ± 8,7	686 ± 93	17,1 ± 3,2
mAb variante YTE - anti-hFXII/FXIIa (REGN17653)	5,0 ± 0,3	0,08 ± 0	209 ± 11	1370 ± 120	7,6 ± 0,7
Anti-Fel D1 (REGN1945)	5,1 ± 0,9	0,08 ± 0	119 ± 4,1	759 ± 87	14 ± 1,9

La presente invención no debe limitarse en su alcance por las modalidades específicas descritas en la presente descripción. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las que se describen en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica

10

a partir de la descripción que antecede. Tales modificaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS INFORMAL

- 5 SEQ ID NO: 1.
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGGTGGTAGTGGTGGTAACACA
10 TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACTC
GCTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGA
GCTTCATACCAGCTGCCATAAGAGGGGGCGACTGGATCGACCCCTGGGGGCCAGGGAAC
CCTGGTCACCGTCTCCTCA;
- 15 SEQ ID NO: 2.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIGGSGGNTY
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASFIPAAIRGGDWIDPWGQGLVTV
SS;
- 20 SEQ ID NO: 3.
GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT GCC;
- SEQ ID NO: 4.
G F T F S S Y A;
- 25 SEQ ID NO: 5.
ATT GGT GGT AGT GGT GGT AAC ACA;
- SEQ ID NO: 6.
30 I G G S G G N T;
- SEQ ID NO: 7.
GCG AGC TTC ATA CCA GCT GCC ATA AGA GGG GGC GAC TGG ATC GAC CCC;
- 35 SEQ ID NO: 8.
A S F I P A A I R G G D W I D P;
- SEQ ID NO: 9.
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
40 CATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATAAGAAATTATTTAGCCTGGTATCAACAGAAAC
CAGGGAAGATTCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCAT
CTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATATTGCAACTTATTACTGTCAATACTATAACAGTGCCCCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA;
- 45 SEQ ID NO: 10.
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKIPKLLIYAASLTQSGVPSRFS
GSGSGTDFLTISLQPEDIATYYCQYYNSAPLTFGGGTKVEIK;

SEQ ID NO: 11.
CAG GGC ATA AGA AAT TAT;

5 SEQ ID NO: 12.
Q G I R N Y;

SEQ ID NO: 13.
GCT GCA TCC;

10 SEQ ID NO: 14.
A A S;

15 SEQ ID NO: 15.
CAA TAC TAT AAC AGT GCC CCG CTC ACT;

SEQ ID NO: 16.
Q Y Y N S A P L T;

20 SEQ ID NO: 17.
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGGTGGTAGTGGTGGTAACACA
TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACTC
25 GCTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGA
GCTTCATACCAGCTGCCATAAGAGGGGGGCGACTGGATCGACCCCTGGGGGCCAGGGAAC
CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCC
TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
30 CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGC
ACCTGAGTTCCTGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCTGCCCCAACCAAGGACACTC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGA
35 CCCCAGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCT
CCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
40 GCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTC
TGGGTAAATGA;

45 SEQ ID NO: 18.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIGGSGGNTY
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASFIPAAIRGGDWIDPWGQGTLVTV

SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
5 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLK*;

SEQ ID NO: 19.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
10 CATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATAAGAAATTATTTAGCCTGGTATCAACAGAAAC
CAGGGAAGATTCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCAT
CTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATATTGCAACTTATTACTGTCAATACTATAACAGTGCCCCGCTCACTTTCCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
15 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT
CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC
ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG;

SEQ ID NO: 20.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKIPKLLIYAASLTQSGVPSRFS
GSGSGTDFLTITSLQPEDIATYYCQYYNSAPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
25 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*;

SEQ ID NO: 21.

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCAC
TCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATC
30 AGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAAGACATACTACAGGTCCAAGT
GGTATAATGATTATACAAAATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCA
AGAACCACTTCTCCCTGCAACTGAACTCTATGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT
GTGCAAGAGAGGTTAGTGGGAGGTACAACTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCCTCA;

SEQ ID NO: 22.

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGKTYYSKQWY
NDYTKSVKSRITINPDTSKNHFSLQLNSMTPEDTAVYYCAREVSGRYNWFDSWGQGLVTV
40 SS;

SEQ ID NO: 23.

GGG GAC AGT GTC TCT AGC AAC AGT GCT GCT;

SEQ ID NO: 24.

G D S V S S N S A A;

SEQ ID NO: 25.

ACA TAC TAC AGG TCC AAG TGG TAT AAT;

SEQ ID NO: 26.
T Y Y R S K W Y N;

5 SEQ ID NO: 27.
GCA AGA GAG GTT AGT GGG AGG TAC AAC TGG TTC GAC TCC;

SEQ ID NO: 28.
A R E V S G R Y N W F D S;

10 SEQ ID NO: 29.
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGACCATTAAACAGTTACTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCGAAGTGGGGTCCCAT
15 CAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAATTACAGAACCTTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA;

20 SEQ ID NO: 30.
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLRSGVPSRFS
GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQNYRTFTFGGGTKVEIK;

SEQ ID NO: 31.
CAG ACC ATT AAC AGT TAC;

25 SEQ ID NO: 32.
Q T I N S Y;

SEQ ID NO: 33.
30 CAA CAG AAT TAC AGA ACC TTC ACT;

SEQ ID NO: 34.
Q Q N Y R T F T;

35 SEQ ID NO: 35.
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCAC
TCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATC
AGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAAGACATACTACAGGTCCAAGT
GGTATAATGATTATACAAAATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCA
40 AGAACCACTTCTCCCTGCAACTGAACTCTATGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT
GTGCAAGAGAGGTTAGTGGGAGGTACAACTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT
45 CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCAC
CTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTC

ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACC
 CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
 GCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
 CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCC
 5 CGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGT
 GTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
 CTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
 CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
 TACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT
 10 CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTG
 GGTAATGA;

SEQ ID NO: 36.

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLKITYYRSKWY
 15 NDYTKSVKSRITINPDTSKNHFSLQLNSMTPEDTAVYYCAREVSGRYNWFDSWGQGLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
 20 TCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*;

SEQ ID NO: 37.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 25 CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGACCATTAAACAGTTACTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC
 AGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCGAAGTGGGGTCCCAT
 CAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
 CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAATTACAGAACCTTCACTTTTCGGCGGA
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC
 30 ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
 TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
 TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
 CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT
 35 AG;

SEQ ID NO: 38.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLRSGVPSRFS
 GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQNYRTFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 40 GTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*;

SEQ ID NO: 39.

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
 45 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCA
 GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGGTGGTAGTGGTGGTAACACA
 TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACTC
 GCTGTATTTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGA

5 GCTTCATACCAGCTGCCATAAGAGGGGGCGACTGGATCGACCCCTGGGGGCCAGGGAAC
CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCC
TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
10 CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGC
ACCTGAGTTCCTGGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCCTCAAGGACACTC
TCTACATCACCCGGGAGCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGA
15 CCCCAGAGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCT
CCCGTCTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
20 GCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTC
TGGGTAAATGA

20

SEQ ID NO: 40.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIGGSGGNTY
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASFIPAAIRGGDWIDPWGQGTTLTV
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
25 GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

