



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019016300-0 A2



(22) Data do Depósito: 29/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 16/06/2020

(54) **Título:** ANTICORPO ANTI-FXI OU ANTI-FXIA ISOLADO, SEU USO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E ANTICORPO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO OU UMA PORÇÃO IMUNOLOGICAMENTE ATIVA DO MESMO

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/36; C12N 15/13; C12N 15/85; A61K 39/395; A61P 7/02; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 10/02/2017 CN 201710073984.X.

(71) **Depositante(es):** SHANGHAI BENEMAE PHARMACEUTICAL CORPORATION.

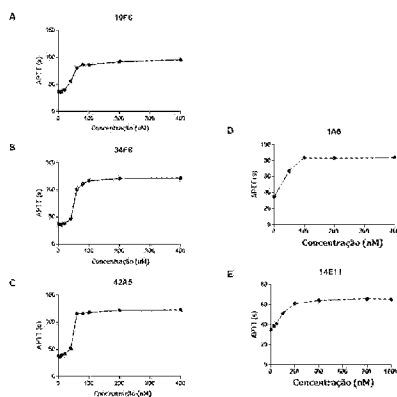
(72) **Inventor(es):** WENYI WANG; QUAN YU; XIAOWU LIU.

(86) **Pedido PCT:** PCT CN2017119856 de 29/12/2017

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/145533 de 16/08/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 07/08/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a um anticorpo combinado com o fator de coagulação XI (FXI) e/ou um fator ativado XIa (FXIa) do mesmo, ou um fragmento de FXI e/ou FXIa, e a uma composição compreendendo o anticorpo. A presente invenção refere-se ainda a um método para preparar o anticorpo e ao uso do anticorpo na preparação de medicamentos para o tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas com a coagulação (por exemplo, trombozes e complicações ou doenças relacionadas com trombos).



**ANTICORPO ANTI-FXI OU ANTI-FXIa ISOLADO, SEU USO E MÉTODO DE
PREPARAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E ANTICORPO OU UM
FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO OU UMA PORÇÃO IMUNOLOGICAMENTE
ATIVA DO MESMO**

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se a anticorpos capazes de se ligar ao fator de coagulação XI (FXI) e/ou ao seu fator XIa (FXIa) de forma ativada e aos fragmentos de FXI e/ou FXIa, e usos do mesmo, incluindo usos como agentes anticoagulação para o tratamento de trombose, que não comprometam a homeostase.

Antecedentes da Invenção

[0002] A trombose é uma condição que envolve a coagulação sanguínea em um vaso sanguíneo, bloqueando ou obstruindo, assim, o fluxo sanguíneo na área afetada. Esta condução pode levar a complicações serias se os coágulos de sangue se deslocam ao longo do sistema circulatório para uma parte crucial do corpo, tais como coração, cérebro e pulmões, levando a ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar, etc. A trombose pode ser tratada ou prevenida por meio de anticoagulantes tais como a heparina e a varfarina. A reação adversa mais comum das terapias disponíveis atualmente é o sangramento. Portanto, essas terapias são limitadas pela dose e pela adesão do paciente devido ao fato de que os pacientes precisam ser monitorados de perto após o tratamento.

[0003] Existe uma necessidade para uma terapia ou profilaxia de trombose eficaz com efeitos colaterais mínimos. A presente invenção satisfaz as necessidades do estado da técnica.

Descrição Resumida da Invenção

[0004] É fornecido no presente, em certas realizações, anticorpos que se ligam ao fator de coagulação XI (FXI) e/ou ao seu fator de forma ativada XIa (FXIa) e a fragmentos de FXI e/ou de FXIa. Em algumas realizações, os anticorpos são anticorpos monoclonais. Em algumas realizações, os anticorpos são anticorpos recombinantes. Em algumas realizações, os anticorpos são anticorpos humanizados. Em algumas realizações, os anticorpos são porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, por exemplo, Fabs, Fvc ou scFvs. Em algumas realizações, os anticorpos ligam-se ao domínio A3 de FXI e/ou FXIa. Em algumas realizações, os anticorpos incluem uma ou mais CDRs consistindo em ou

compreendendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 11-16, 27-32, 43-48, 59-64, 75-80, 91-96, 107-112, 123-128, 139-144, 155-160, 171-176 e 187-192.

[0005] É fornecida no presente uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou a prevenção de trombose e/ou de complicações ou condições associadas à trombose. A composição farmacêutica compreende um ou mais anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa, conforme descritos no presente. Em algumas realizações, a composição farmacêutica compreende ainda um ou mais adjuvantes, veículos, excipientes, conservantes ou conservantes farmaceuticamente aceitáveis, ou uma combinação dos mesmos.

[0006] É fornecido no presente um ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-FXI e/ou anti-FXIa, conforme descrito no presente, ou um fragmento funcional de qualquer anticorpo, bem como um vetor compreendendo o ácido nucleico e uma célula hospedeira compreendendo o vetor. Em algumas realizações, o vetor é um vetor de expressão que é capaz de produzir o anticorpo ou um fragmento funcional do mesmo codificado pelo ácido nucleico em uma célula hospedeira.

[0007] É fornecido no presente um kit que compreende um ou mais anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa, conforme descritos no presente, para uso no tratamento e/ou na prevenção de trombose e/ou de complicações ou condições associadas à trombose. Alternativamente, o kit compreende uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa, conforme descritos no presente, para uso no tratamento e/ou na prevenção de trombose e/ou de complicações ou condições associadas à trombose. Em certas realizações, o kit compreende ainda instruções de uso.

[0008] É fornecido no presente um método de tratamento e/ou prevenção de trombose e/ou de complicações ou condições associadas à trombose. O método inclui a administração a um sujeito em necessidade do mesmo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa, conforme descritos no presente. Alternativamente, o método inclui a administração a um sujeito em necessidade do mesmo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica contendo um anticorpo anti-FXI, um anticorpo anti-FXIa ou um fragmento funcional de qualquer um dos anticorpos.

[0009] É fornecido no presente um uso de um anticorpo anti-FXI e/ou anti-FXIa, como

descrito no presente, formulando um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de trombose e/ou de complicações ou condições associadas à trombose.

[0010] É fornecido no presente um método de produção de um anticorpo anti-FXI e/ou anti-FXIa, conforme descrito no presente. O método envolve as etapas de transformação de uma célula hospedeira com um vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica o anticorpo, e expressa o anticorpo na célula hospedeira. O método pode ainda incluir a purificação do anticorpo expresso a partir da célula hospedeira. Adicionalmente, o anticorpo purificado pode ser submetido a modificações de modo que o anticorpo recombinante modificado retenha a atividade do anticorpo humano correspondente. Alternativamente, um anticorpo descrito no presente pode ser produzido a partir da cultura de um hibridoma.

Breve Descrição dos Desenhos

[0011] A Figura 1 ilustra os efeitos de cinco anticorpos anti-FXI via ensaio APTT no plasma humano. O plasma humano suplementado com cinco anticorpos diferentes em uma concentração variando de 0 a 400 nM foi testado em um ensaio APTT como descrito no Exemplo 2. Os cinco anticorpos testados incluíram 19F6 (A), 34F8 (B), 42A5 (C), 1A6 (D) e 14E11 (E). Os anticorpos 1A6 e 14E11 foram usados como controles positivos nesta experiência.

[0012] A Figura 2 ilustra os efeitos dos anticorpos 19F6 (A), 34F8 (B) e 42A5 (C) no ensaio APTT no plasma de macacos. O plasma de macaco suplementado com três anticorpos diferentes em uma concentração variando de 0 a 400 nM foi testado em um ensaio APTT como descrito no Exemplo 3.

[0013] A Figura 3 ilustra sensogramas de SPR para ligação de FXI a h-19F6 (A), h-34F8 (B) e h-42A5 (C) imobilizados, bem como sensogramas de SPR para ligação de FXIa a h-19F6 (D), h-34F8 (E) e h-42A5 (F) imobilizados. Os dados foram ajustados com o modelo de ligação 1:1 e os ajustes das curvas nas concentrações de FXI (0,005-1 ng/ml) são mostrados sobrepostos nos sensogramas. Cada curva indica uma concentração de teste diferente de FXI ou FXIa.

[0014] A Figura 4 ilustra as curvas de concentração-resposta dos anticorpos h-19F6 (A), h-34F8 (B) e h-42A5 (C) que inibem o FXIa humano da hidrólise de S-2366.

[0015] A Figura 5 ilustra os efeitos inibitórios dos anticorpos h-19F6 (A) e h-42A5 (B) na

ativação de FIX mediada por FXIa para FIXa. O FIX humano (200 nM) foi incubado com FXIa (5 nM) em PBS com CaCl_2 a 5 mM à temperatura ambiente com IgG controle a 1 μM ou h-19F6 ou h-42A5. Nos intervalos indicados, as amostras foram coletadas e o FIX, bem como o FIXa, foram determinados por Western blot utilizando IgG de FIX anti-humano de cabra (Affinity Biologicals).

[0016] A Figura 6 ilustra os efeitos dos anticorpos h-34F8, h-19F6 e h-42A5 no APTT em macacos cynomolgus. Os macacos foram administrados por via intravenosa com doses indicadas de h-34F8 (A), h-19F6 (B) e h-42A5 (C). O tempo de coagulação *ex vivo* APTT foi determinado na pré-dose (tempo 0) e 0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a dose.

[0017] A Figura 7 ilustra os efeitos dos anticorpos h-34F8, h-19F6 e h-42A5 na PT em macacos cynomolgus. Os macacos foram administrados por via intravenosa com as doses indicadas de h-34F8 (A), h-19F6 (B) e h-42A5 (C). O tempo de coagulação *ex vivo* PT foi determinado na pré-dose (tempo 0) e 0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a dose.

[0018] A Figura 8 ilustra os efeitos dos anticorpos h-34F8, h-19F6 e h-42A5 na trombose de derivação AV em macacos cynomolgus. Os níveis crescentes de h-34F8 (A), h-19F6 (B) ou h-42A5 (C) foram administrados por via intravenosa a macacos ($n = 3$ para h-34F8 e h-19F6; $n = 4$ para h-42A5), alterações de peso do coágulo em relação à pré-dose foram determinadas no modelo de macaco de trombose de derivação AV. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$ vs. Veículo.

[0019] A Figura 9 ilustra os efeitos dos anticorpos h-34F8, h-19F6 e h-42A5 no tempo de sangramento em macacos cynomolgus. Os níveis crescentes de h-34F8 (A), h-19F6 (B) ou h-42A5 (C) foram administrados por via intravenosa a macacos ($n = 3$ para 34F8 e h-19F6; $n = 4$ para h-42A5), o tempo de sangramento foi avaliado na pré-dose e a 30 minutos após cada dose.

[0020] A Figura 10 ilustra os efeitos antitrombóticos dos anticorpos h-34F8, h-19F6 e h-42A5. Quatro grupos de macacos ($n = 5$) foram administrados por via intravenosa com o veículo, 0,3 mg/kg de h-34F8, h-19F6 ou h-42A5, por 2 horas, e FeCl_3 foi aplicado na artéria femoral esquerda de cada animal para induzir trombose. Os tempos para 80% de oclusão trombótica (A) e para 100% de oclusão trombótica (B) foram determinados pelo monitoramento da velocidade do fluxo sanguíneo. $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$ vs. veículo.

[0021] A Figura 11 ilustra que o tratamento com anticorpos h-34F8, h-19F6 ou h-42A5 não prolongou o tempo de sangramento em macacos. Quatro grupos de macacos ($n = 5$) foram administrados por via intravenosa com o veículo, 0,3 mg/kg de h-34F8, h-19F6 ou h-42A5, e o tempo de sangramento do modelo foi medido pré-dose e 1 hora após a dose. O tempo de sangramento individual nos grupos tratados com h-34F8, h-19F6 e h-42A5 é mostrado em (A), (B) e (C), respectivamente. A alteração do tempo de sangramento no tratamento com veículo, h-34F8, h-19F6 ou h-42A5 é mostrada em (D).

[0022] A Figura 12 ilustra os efeitos dos anticorpos h-34F8, h-19F6 e h-42A5 nos tempos de coagulação do plasma de macaco. Quatro grupos de macacos ($n = 5$) foram administrados por via intravenosa com o veículo, 0,3 mg/kg de h-34F8, h-19F6 e h-42A5, respectivamente, e o sangue foi coletado pré-dose e cerca de 3 horas após a dose para preparação de plasma e tempo de coagulação, determinação de APTT e PT. As alterações APTT e alterações PT são mostradas em (A) e (B), respectivamente. $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ vs. veículo.

[0023] A Figura 13 ilustra a sequência de aminoácidos do FXI humano (SEQ ID NO: 203).

Descrição Detalhada da Invenção

[0024] A descrição a seguir da presente invenção é meramente ilustrativa de várias realizações da presente invenção. Como tal, as modificações específicas discutidas não devem ser interpretadas como limitações no escopo da presente invenção. Será evidente para um técnico no assunto que vários equivalentes, alterações e modificações podem ser feitos sem se afastar do escopo da presente invenção, e é entendido que tais realizações equivalentes devem ser incluídas no presente.

[0025] Tanto a via intrínseca como a via extrínseca estão envolvidas em cascatas de coagulação sanguínea *in vivo*. A via intrínseca, também chamada de via de ativação de contato, é iniciada pelo contato com uma interface de superfície e resulta na ativação do FXII. A via intrínseca também envolve FXI, FIX e FVIII. A via extrínseca, também chamada de fator tecidual (TF), é iniciada por lesão vascular e resulta na formação de um complexo ativado de TF-FVIIa. Essas duas vias se encontram e ativam a via comum, levando à conversão de protrombina em trombina e eventualmente à formação de coágulo de fibrina reticulado. Os anticorpos descritos no presente ligam-se a FXI e/ou a FXIa e têm como alvo

a via intrínseca da coagulação sanguínea. A estrutura do envolvimento do FXI e do FXI na coagulação sanguínea foi relatada em várias publicações. Vide, por exemplo, Emsley et al., *Blood* 115 (13): 2569-2577 (2010), cujo conteúdo é incorporado por referência.

Anticorpos Anti-FXI ou Anti-FXIa

[0026] São fornecidos no presente anticorpos que se ligam a FXI, FXIa e/ou a um fragmento de FXI ou FXIa e inibem a formação de coágulo sanguíneo. Estes anticorpos são capazes de se ligar a FXI, FXIa e/ou a um fragmento de FXI ou FXIa (por exemplo, um fragmento compreendendo o domínio A3) e exibir um efeito inibidor a uma concentração que é muito menor do que a dose mínima de segurança. Por exemplo, em algumas realizações, uma dose do anticorpo entre 0,1 mg/kg i.v. e 3 mg/kg i.v. exibe um efeito inibitório na conversão de FXI em FXIa em macacos cynomolgus. Além disso, os anticorpos descritos no presente podem ser utilizados como agentes de anticoagulação com segurança superior devido ao seu risco mínimo de causar hemorragia versus agentes de anticoagulação convencionais, tais como a heparina.

[0027] Como utilizado no presente, o termo "compreendendo" com relação a uma composição ou um método significa que a composição ou o método inclui pelo menos os elementos citados. O termo "consistindo essencialmente em" significa que a composição ou o método inclui os elementos recitados, e pode ainda incluir um ou mais elementos adicionais que não afetam materialmente as características novas e básicas da composição ou método. Por exemplo, uma composição consistindo essencialmente nos elementos citados pode incluir os elementos citados mais um ou mais contaminantes vestigiais do método de isolamento e purificação, veículos farmacologicamente aceitáveis, como solução salina tamponada com fosfato, conservantes e similares. O termo "consistindo em" significa que a composição ou método inclui apenas os elementos citados. Realizações definidas por cada um dos termos de transição estão dentro do escopo desta invenção.

[0028] O termo "anticorpo", como usado no presente, refere-se a uma molécula de imunoglobulina ou uma porção imunologicamente ativa da mesma que se liga especificamente, ou é imunologicamente reativa com um antígeno particular, por exemplo, FXI, FXIa, ou um domínio particular ou fragmento de FXI ou FXIa, por exemplo, o domínio A3. Em certas realizações, um anticorpo para uso nos presentes métodos, composições e

kits é uma molécula de imunoglobulina de comprimento total, que compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, com cada cadeia pesada e leve contendo três regiões determinantes complementares (CDRs). O termo "anticorpo", além de anticorpos naturais, também inclui formas modificadas geneticamente ou outras formas de imunoglobulinas, tais como anticorpos sintéticos, intracorpos, anticorpos quiméricos, anticorpos totalmente humanos, anticorpos humanizados, peptícorpos e anticorpos heteroconjugados (por exemplo, anticorpos biespecíficos, anticorpos multiespecíficos, anticorpos duplos específicos, anticorpos anti-idiotípicos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos). Os anticorpos descritos no presente podem ser anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais. Naquelas realizações em que um anticorpo é uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina, o anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo Fab, Fab', Fy, Fab' F(ab')₂, Fv ligado por dissulfeto, Fv de cadeia simples (scFv), anticorpo de domínio único (dAb) ou diacorpo. Os anticorpos descritos no presente, incluindo aqueles que são porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina, retêm a capacidade de se ligar a um antígeno específico, por exemplo, FXI ou FXIa, ou a se ligar um fragmento específico de FXI ou FXIa, tal como o domínio A3.

[0029] Em algumas realizações, os anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa descritos no presente sofreram modificações pós-translacionais, tais como fosforilação, metilação, acetilação, ubiquitinação, nitrosilação, glicosilação ou lipidação associada à expressão em uma linhagem celular de mamífero, incluindo uma célula hospedeira humana ou não humana. Técnicas para produzir anticorpos recombinantes e para modificações *in vitro* e *in vivo* de anticorpos recombinantes são conhecidas no estado da técnica. Vide, por exemplo, Liu et al., *mAbs* 6(5): 1145-1154 (2014), cujo conteúdo é incorporado por referência.

[0030] Também são descritos polinucleotídeos ou ácidos nucleicos que codificam os anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa descritos no presente. Em algumas realizações, o polinucleotídeo ou ácido nucleico inclui DNA, mRNA, DNAc, DNA plasmídeo. O ácido nucleico que codifica o anticorpo ou um fragmento funcional deste descrito no presente pode ser clonado em um vetor, como um vetor de expressão em mamífero pTT5, que pode incluir ainda um promotor e/ou outros elementos de controle de transcrição ou tradução, de modo que o ácido nucleico possa ser expresso para produzir o anticorpo ou o seu fragmento funcional.

[0031] As sequências de ácido nucleico (DNA) e/ou aminoácido (PRT), incluindo as sequências de VH e VL e CDRs, de alguns exemplos dos anticorpos descritos no presente estão listadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1
Sequências de anticorpos

Descrição	SEQ ID NO	Tipo	Sequência
3G12-VL	1	DNA	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGT CTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCG AAAGTGTTGATAATTATGCCATTAGTTTTATGAACTGGTT CCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT GCTGCATCCAACCTAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTT AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATC CATCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGT CAGCAAGATAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGC ACCGAGCTGGAAATCAAA
3G12-VH	2	DNA	CAGGTCACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAG CCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGT TTTCACTGAACACTCCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTG GTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGCACACA TTTACTGGGATGATGACAAGCGCTTTAACCCATCCCTGAA GAGCCGACTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAGATCA GGTATTCCTCATGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATTCT GCCACATACTTCTGTGCTCGAAAAGGCCGCGGGCCCTTT ACTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA
3G12-CDR-L1	3	DNA	AGAGCCAGCGAAAGTGTTGATAATTATGCCATTAGTTTTA TGAAC
3G12-CDR-L2	4	DNA	GCTGCATCCAACCTAGGATCC
3G12-CDR-L3	5	DNA	CAGCAAGATAAGGAGGTTCCGTGGACG
3G12-CDR-H1	6	DNA	ACTCCTGGTATGGGTGTGAGC
3G12-CDR-H2	7	DNA	CACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTTTAACCCATCCC TGAAGAGC
3G12-CDR-H3	8	DNA	AAAGGCCGCGGGCCCTTTACTTAC
3G12-VL	9	PRT	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYAISFMNWFQ QKPGQPPKLLIYAASNLGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPM EEDDTAMYFCQQDKEVPWTFGGGTELEIK

3G12-VH	10	PRT	QVTLKESGPGILQPSQTLTLCSFSGFSLNTPGMGVSWIRQ PSGKGLEWLAHIYWDDDKRFNPSLKSRLTISKDTSRDQVF LMITSVDTADSATYFCARKGRGPFTYWGQGLTVTVSS
3G12-CDR-L1	11	PRT	RASESVDNYAISFMN
3G12-CDR-L2	12	PRT	AASNLGS
3G12-CDR-L3	13	PRT	QQDKEVPWT
3G12-CDR-H1	14	PRT	TPGMGVS
3G12-CDR-H2	15	PRT	HIYWDDDKRFNPSLKS
3G12-CDR-H3	16	PRT	KGRGPFTY
5B2-VL	17	DNA	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCCTCTTTGGCTGTGT CTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCG AAAGTGTTGATAATTATGGCATTAGTTTTCTGAACTGGTT CCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT GCTGCATCCAATCTAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTT AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATC CATCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGT CAGCAAGATAAGGGGGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGG CACCAAGCTGGAAATGAAA
5B2-VH	18	DNA	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGC CCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGT TTCACTGAACACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTG CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTT ACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAACCATCCCTGAAGAG CCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTA TTCCTCATGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCA CATACTACTGTGTTGAAAAGGCCGCGGGCCCTTTGCTAA CTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
5B2-CDR-L1	19	DNA	AGAGCCAGCGAAAGTGTTGATAATTATGGCATTAGTTTT CTGAAC
5B2-CDR-L2	20	DNA	GCTGCATCCAATCTAGGATCC
5B2-CDR-L3	21	DNA	CAGCAAGATAAGGGGGTTCCGTGGACG
5B2-CDR-H1	22	DNA	ACTTCTGGTATGGGTGTGAGC
5B2-CDR-H2	23	DNA	CACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAACCATCCC TGAAGAGC
5B2-CDR-H3	24	DNA	AAAGGCCGCGGGGCCCTTTGCTAAC

5B2-VL	25	PRT	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFLNWFQ QKPGQPPKLLIYAASNLGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPM EEDDTAMYFCQQDKGVPWTFGGGKLEMK
5B2-VH	26	PRT	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLNTSGMGVSWIRQ PSGKGLEWLAHIYWDDDKRYKPSLKSRLTISKDTSRNQVF LMITSVDTADTATYYCVRKGRGPFANWGGQGLTVSA
5B2-CDR-L1	27	PRT	RASESVDNYGISFLN
5B2-CDR-L2	28	PRT	AASNLGSG
5B2-CDR-L3	29	PRT	QQDKGVPWT
5B2-CDR-H1	30	PRT	TSGMGVS
5B2-CDR-H2	31	PRT	HIYWDDDKRYKPSLKS
5B2-CDR-H3	32	PRT	KGRGPFAN
7C9-VL	33	DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCT CTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCGGGCAAGTC AGGACATTGATATTCGCTTAACTGGCTTCGACAGGAAC CAGATGGAACATTAAACGCCTGATCTACGCCACATCCAG TTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGGTTTCAGTGGCAGTAG GTCTGGGTGAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAG TCTGAAGATTTTGTGACTATTACTGTCTACAATATGCTA GTTCTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAA TAAAA
7C9-VH	34	DNA	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAACTGAAGAAGC CTGGAGAGACCGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTA TATTTTCACAGACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCT CCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCT ACACTGGAGAGCCAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACG GTTTGTCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTAT TTACAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACAT TTTTCTGTGCAAGAAGGAGGATGGGTTATGCTGTGGACTA CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
7C9-CDR-L1	35	DNA	CGGGCAAGTCAGGACATTGATATTCGCTTAAAC
7C9-CDR-L2	36	DNA	GCCACATCCAGTTTAGATTCT
7C9-CDR-L3	37	DNA	CTACAATATGCTAGTTCTCCATTCACG
7C9-CDR-H1	38	DNA	GACTATGGAATGAAC

7C9-CDR-H2	39	DNA	TGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATGCTGAT GACTTCAAGGGA
7C9-CDR-H3	40	DNA	AGGAGGATGGGTTATGCTGTGGACTAC
7C9-VL	41	PRT	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIDIRLNWLRQEPD GTIKRLIYATSSLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFV DYYCLQYASSPFTFGSGTKLEIK
7C9-VH	42	PRT	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTDYGMNWVKQA PGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFVFSLETSASTAY LQINNLIKNETATFFCARRRMGYAVDYWGQGSVTVSS
7C9-CDR-L1	43	PRT	RASQDIDIRLN
7C9-CDR-L2	44	PRT	ATSSLDS
7C9-CDR-L3	45	PRT	LQYASSPFT
7C9-CDR-H1	46	PRT	DYGMN
7C9-CDR-H2	47	PRT	WINTYTGEPTYADDFKG
7C9-CDR-H3	48	PRT	RRMGYAVDY
7F1-VL	49	DNA	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGT CTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCG AAAGTGTTGATAATTATGCCATTAGTTTTATGAATTGGTT CCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT GCTGCATCCAACCTAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTT AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATC CATCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGT CAGCAAGATAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGC ACCAAGCTGGAGCTGAAA
7F1-VH	50	DNA	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATAGTGCAG CCCTCCCAGACCCTCAATCTGACTTGTTCTTTCTCTGGATT TTCCTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTG CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGATTGGCTGGCACACATTT ACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCCTGATGAG CCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTA TTCCTCATGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCA CATACTACTGTGCTCGAAAAGGCCGCGGGCCCTTTGCTT ACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA
7F1-CDR-L1	51	DNA	AGAGCCAGCGAAAGTGTTGATAATTATGCCATTAGTTTTA TGAAT
7F1-CDR-L2	52	DNA	GCTGCATCCAACCTAGGATCC

7F1-CDR-L3	53	DNA	CAGCAAGATAAGGAGGTTCCGTGGACG
7F1-CDR-H1	54	DNA	ACTTCTGGTATGGGTGTGAGC
7F1-CDR-H2	55	DNA	CACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCC TGATGAGC
7F1-CDR-H3	56	DNA	AAAGGCCGCGGGCCCTTTGCTTAC
7F1-VL	57	PRT	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYAISFMNWFQ QKPGQPPKLLIYAASNLGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPM EEDDTAMYFCQQDKEVPWTFGGGTKLELK
7F1-VH	58	PRT	QVTLKESGPGIVQPSQTLNLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQ PSGKGLDWLAHIYWDDDKRYNPSLMSRLTISKDTSRNQVF LMITSVDTADTATYYCARKGRGPFAYWGQGT LVTVSS
7F1-CDR-L1	59	PRT	RASESVDNYAISFMN
7F1-CDR-L2	60	PRT	AASNLGS
7F1-CDR-L3	61	PRT	QQDKEVPWT
7F1-CDR-H1	62	PRT	TSGMGVS
7F1-CDR-H2	63	PRT	HIYWDDDKRYNPSLMS
7F1-CDR-H3	64	PRT	KGRGPFAY
13F4-VL	65	DNA	CAGTTCACGCTGACTCAACCAAAGTCCGTGTCAGGATCTT TAAGAAGCACTATCACCATTCCCTGTGAGCGCAGCAGTG GTGACATTGGAGATAGCTATGTGAGCTGGTACCAACAAC ACTTGGGAAGACCCCCCATCAATGTGATCTATGCTGATG ATCAAAGACCATCTGAAGTGTCTGCTCGGTTCTCGGGCT CCATCGACAGCTCCTCTAACTCAGCCTCACTGACCATCAC TAATCTACAGATGGATGATGAGGCCGACTACTTCTGTCA GTCTTACGATACTTATATGGATGTTGTGTTCTCGGTGGTGG AACCAAGCTCAATGTCCTA

13F4-VH	66	DNA	GAGGTGCAGCTGAAGGAATCAGGACCTGGTCTGGTGCAG CCCTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGAT TCTCATTAACGGACTACAGTGTACACTGGGTTTCGCCAGC CTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGATGGGAGTAATGTGGA GTGGTGGGAAGCACAGCATATAATCCAGCTCTCACATCCC GACTGACCATTAGCAGGGACACCTCCAAGAGCCAAGTTT TCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAAGTGAAGATACAGCCAT TTACTACTGTACCAGAGCACCTTTTAACTGGGGCAAT TGGCTTCCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTC TCTTCA
13F4-CDR-L1	67	DNA	GAGCGCAGCAGTGGTGACATTGGAGATAGCTATGTGAGC
13F4-CDR-L2	68	DNA	GCTGATGATCAAAGACCATCT
13F4-CDR-L3	69	DNA	CAGTCTTACGATACTTATATGGATGTTGTG
13F4-CDR-H1	70	DNA	GACTACAGTGTACAC
13F4-CDR-H2	71	DNA	GTAATGTGGAGTGGTGGGAAGCACAGCATATAATCCAGCT CTCACATCC
13F4-CDR-H3	72	DNA	GCACCTTTTAACTGGGGCAATTGGCTTCCTTAC
13F4-VL	73	PRT	QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGDSYVSWYQQHL GRPPINVIYADDQRPSEVSARFSGSIDSSSNSASLTITNLQM DDEADYFCQSYDTYMDVVFGGGTKLNVL
13F4-VH	74	PRT	EVQLKESGPGVLVQPSQTLSTCTVSGFSLTDYSVHWVRQPP GKGLEWMGMVWSGGSTAYNPALTSRLTISRDTSKSQVFLK MNSLQTEDTAIYYCTRPFNNWGNWLPYWGQGLTVTVSS
13F4-CDR-L1	75	PRT	ERSSGDIGDSYVS
13F4-CDR-L2	76	PRT	ADDQRPS
13F4-CDR-L3	77	PRT	QSYDTYMDVW
13F4-CDR-H1	78	PRT	DYSVH
13F4-CDR-H2	79	PRT	VMWSGGSTAYNPALTS
13F4-CDR-H3	80	PRT	APFNNWGNWLPY

19F6-VL	81	DNA	CAATTCACGCTGACTCAACCAAAGTCCGTGTCAGGCTCTT TAAGAAGCACTATCACCATTCCCTGTGAGCGCAGCAGTG GTGACATTGGAGATAGCTATGTGAGCTGGTACCAGCAAC ACTTGGGAAGACCCCCCATCAATGTGATCTATGCTGATG ATCAAAGACCATCTGAAGTGTCTGATCGGTTCTCGGGCT CCATCGACACCTCCTCTAACTCAGCCTCACTGACCATCAC TAATCTGCAGATGGATGATGCGGCCGACTACTTCTGTCA GTCTTACGATAGTAATATTGATTTTAACCCTGTTTTCGGT GGTGAACCAAGCTCACTGTCCTA
19F6-VH	82	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCA GCCTGGAAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCAGG ATTCATTTTCAGTAAATATGTCATGGCCTGGGTCCGCCAG GCTCCAACGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGCATCCATTAAT TATGATGGTAGTACCACTTACTATCGAGACTCCGTGCAG GGCCGGTTCACTCTCTCCAGAGATAATGCAAAAACCAACC TATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGG CCACTTATTACTGTGCAAGGCACCCTTTTAACAACTTCGG GATTTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCAC TGTCTCTTCA
19F6-CDR-L1	83	DNA	GAGCGCAGCAGTGGTGACATTGGAGATAGCTATGTGAGC
19F6-CDR-L2	84	DNA	GCTGATGATCAAAGACCATCT
19F6-CDR-L3	85	DNA	CAGTCTTACGATAGTAATATTGATTTTAACCCTGTT
19F6-CDR-H1	86	DNA	AAATATGTCATGGCC
19F6-CDR-H2	87	DNA	TCCATTAATTATGATGGTAGTACCACTTACTATCGAGACT CCGTGCAGGGC
19F6-CDR-H3	88	DNA	CACCCTTTTAACAACTTCGGGATTTGGTTTGCTTAC
19F6-VL	89	PRT	QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCRSSGDIGDSYVSWYQQHL GRPPINVIYADDQRPSEVSDRFSGSIDTSSNSASLTITNLQ MDDAADYFCQSYDSNIDFNPVFGGGTKLTVL
19F6-VH	90	PRT	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSKYVMAWVRQAP TKGLEWVASINYDGSTTYRDSVQGRFTLSRDNAKTTLYLQ MDSLRS EDTATYYCARHPFN NFGIWFAYWGQGLTVTVSS
19F6-CDR-L1	91	PRT	ERSSGDIGDSYVS
19F6-CDR-L2	92	PRT	ADDQRPS
19F6-CDR-L3	93	PRT	QSYDSNIDFNPV

19F6-CDR-H1	94	PRT	KYVMA
19F6-CDR-H2	95	PRT	SINYDGSTTYRDSVQG
19F6-CDR-H3	96	PRT	HPFNNFGIWFAY
21F12-VL	97	DNA	GATGTCCGGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCA TCTCTGGGAGAACTGTCAACATCGAATGTCTAGCAAGT GAGGACATTTACAGTGATTTAGCATGGTATCAGCAGAAG CCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAATA GTCTACAAAATGGGGTCCCTTCACGGTTTAGTGGCAGTG GTTCTGGCACGCAGTATTCTCTAAAAATATCCACCCTGCA ATCTGAAGATGTCGCGACTTATTTCTGTCAACAATATAGC AATTATCGTCGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAA ATCAAT
21F12-VH	98	DNA	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTAGTGCA GCCTGGAAGGTCTCTGAACTATCCTGTGTAGCCTCTGG ATTCACATTCAACAACCACTGGATGACCTGGATCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATCCATTACT GATAATGGTGGTAGCACTTACTATCCAGACTCTGTGAAG GGCCGATTCACTATCTCCAGAGATAATGCAAAAAGCACCC TATACCTGCACATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGG CCACTTATTACTGTACAAGAGATCGGTATGACTCTGATGG TTATTATTACGTGAGGTACTATGTTGTGGACGCCTGGGG TCAAGGAGCTTCAGTCACTGTCTCCTCA
21F12-CDR-L1	99	DNA	CTAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGATTTAGCA
21F12-CDR-L2	100	DNA	AATGCAAATAGTCTACAAAAT
21F12-CDR-L3	101	DNA	CAACAATATAGCAATTATCGTCGGACG
21F12-CDR-H1	102	DNA	AACCACTGGATGACC
21F12-CDR-H2	103	DNA	TCCATTACTGATAATGGTGGTAGCACTTACTATCCAGACT CTGTGAAGGGC
21F12-CDR-H3	104	DNA	GATCGGTATGACTCTGATGGTTATTATTACGTGAGGTAC TATGTTGTGGACGCC
21F12-VL	105	PRT	DVRMTQSPASLSASLGETVNIECLASEDIYSDLAWYQQKPG KSPQLLIYNANSLQNGVPSRFSGSGSGTQYSLKISTLQSED VATYFCQQYSNYRRTFGGGTKLEIN
21F12-VH	106	PRT	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSVASGFTFNNHWMWIRQ APGKGLEWVASITDNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNASTLY LHMNSLRSEDTATYYCTRDYDSDGYYYVRYVVDWAGQ GASVTVSS

21F12-CDR-L1	107	PRT	LASEDIYSDLA
21F12-CDR-L2	108	PRT	NANSLQN
21F12-CDR-L3	109	PRT	QQYSNYRRT
21F12-CDR-H1	110	PRT	NHWMT
21F12-CDR-H2	111	PRT	SITDNGGSTYYPDVSKG
21F12-CDR-H3	112	PRT	DRYDSDGYYYVRYVVDA
34F8-VL	113	DNA	GATGTTGTGTTGACACAGACTCCAGGTTCCCTGTCTGTC ACACTTGGACAGCAAGTTTCTATATCCTGTAGGTCTAGTC AGAGCCTGGAAAGTCGTGATGGGAACACTTATTTGGAAT GGTACCTACAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGGTCCTCC TCTATGGAGTTTCCAACCGATTGTCTGGGGTCCCAGACA GGTTCCTTGGCAGAGGGTCAGGGGCAGATTTACCCTCA AGATCAGCAGAGTAGAGCCTGAGGACTTGGGAGTTTATT ACTGCTTCCAAGCTACACATGGTCCATTACGTTTCGGCTC AGGGACGAAGTTGGAAATGAAA
34F8-VH	114	DNA	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGCAG CCCTCACAGACCCTGTCTCTCACCTGCACTGTCTCTGGGT TCTCATTAACCACTATCATGTGCACTGGGTTTCGACAGCC TCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGATGGGAATAATGTGGAG AGATGGAGACACATCATATAATTCAAGTTCTCAAATCTCGA CTGAGCATCAGCAGGGACATCTCCAAGAGCCAAGTTTTTC TTAAAAATGAGCAGTCTGCAAAGTGAAGACACAGCCACTT ACTTCTGTGCCAGAGGGGGGACTCTTACAACCTCCCTTTA CTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCA
34F8-CDR-L1	115	DNA	AGGTCTAGTCAGAGCCTGGAAAGTCGTGATGGGAACACT TATTTGGAA
34F8-CDR-L2	116	DNA	GGAGTTTCCAACCGATTGTCT
34F8-CDR-L3	117	DNA	TTCCAAGCTACACATGGTCCATTACG
34F8-CDR-H1	118	DNA	ACCTATCATGTGCAC
34F8-CDR-H2	119	DNA	ATAATGTGGAGAGATGGAGACACATCATATAATTCAAGTT CTCAAATCT
34F8-CDR-H3	120	DNA	GGGGGGACTCTTACAACCTCCCTTTACTTAC
34F8-VL	121	PRT	DVVLTPGSLSVTLGQQVSISCRSSQSLESRDGNTYLEW YLQKPGQSPQVLLYGVSNRLSGVPDRFLGRGSGADFTLKIS RVEPEDLGYYCFQATHGPFTFGSGTKLEMK

34F8-VH	122	PRT	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTTYHVHWVRQP PGKGLEWMGIMWRDGDTSYNSVLKSRLSISRDISKSQVFL KMSSLQTEDTATYFCARGGTLTPPTYWGQGLTVTVSS
34F8-CDR-L1	123	PRT	RSSQSLESRDGNTYLE
34F8-CDR-L2	124	PRT	GVSNRLS
34F8-CDR-L3	125	PRT	FQATHGPFT
34F8-CDR-H1	126	PRT	TYHVH
34F8-CDR-H2	127	PRT	IMWRDGDTSYNSVLKS
34F8-CDR-H3	128	PRT	GGTLTPPTY
38E4-VL	129	DNA	GATATCCGGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCAT CTCTGGGAGAACTGTCAACATCGAATGTCTAGCAAGTGA GGACATTTACAGTGATTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCA GGGAAATCTCCACAACTCCTGATCTATAATGCAAATAGCGT GCAAAATGGGGTCCCTTCACGGTTTAGTGCCAGTGGATCT GGCACACAGTATTCTCTAAAAATAAACAGCCTGCAATCTGA AGATGTCGCGACTTATTTCTGTCAACAGTTTAAACAGTTATC CGAACACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAAATCAAA
38E4-VH	130	DNA	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAAC CCTCACAGTCACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCTCTGGTTTC TCCATCACTAATAATTACTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCC CAAGAAATAAAATGGAGTGGATTGGACACATAAGCTACAG TGGTAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGCATCT CCATTACTAGAGACTCATCGAAGAGTCAGTTCTTCCTGCA GTTGAACTCTTTAACTACTGAGGACACAGCCACATATTACT GTGCAAGAGGATCTTATTACTATAGCGCATCGGGCTACTT TGATTATTGGGGCCAAGGAATCACGGTCACAGTCTCCTCA
38E4-CDR-L1	131	DNA	CTAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGATTTAGCA
38E4-CDR-L2	132	DNA	AATGCAAATAGCGTGCAAAAT
38E4-CDR-L3	133	DNA	CAACAGTTTAAACAGTTATCCGAACACG
38E4-CDR-H1	134	DNA	AATAATTACTGGGGC
38E4-CDR-H2	135	DNA	CACATAAGCTACAGTGGTAGCACTAACTACAACCCATCTC TCAAAAGT
38E4-CDR-H3	136	DNA	GGATCTTATTACTATAGCGCATCGGGCTACTTTGATTAT

38E4-VL	137	PRT	DIRMTQSPASLSASLGETVNIIECLASEDIYSDLAWYQQKPG KSPQLLIYNANSVQNGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSED VATYFCQQFNSYPNTFGAGTKLEIK
38E4-VH	138	PRT	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVSGFSITNNYWGWIWKFP RNKMEWIGHISYSGSTNYNPSLKSRIISITRDSSKSQFFLQL NSLTTEDTATYYCARGSYYYASAGYFDYWGQGITVTVSS
38E4-CDR-L1	139	PRT	LASEDIYSDLA
38E4-CDR-L2	140	PRT	NANSVQN
38E4-CDR-L3	141	PRT	QQFNSYPNT
38E4-CDR-H1	142	PRT	NNYWG
38E4-CDR-H2	143	PRT	HISYSGSTNYNPSLKS
38E4-CDR-H3	144	PRT	GSYYYSASGYFDY
42A5-VL	145	DNA	GACGTGGTCTTGACCCAAACCCCTGGATCACTTAGCGTG ACACTGGGCGATCCAGCATCAATGTCCTGCAGAAAGCTCC CAGTCCTTGGAGAGTAGCGACGGCAACACATACCTCGAG TGGTATCTGCAGAAATCCGGGCAGTCCCCACAGCTGCTG ATCTACGGCGTGAGTAACAGGTTTCAGCGGGGTGCCTGAT AGGTTTCGCCGGCAGCGGGTCCGGGACAGATTTTACTCTC AAGATTAGCCGCGTCGAACCCGAGGACCTGGGCGTGTAC TACTGTTTTTCAGGCCACTCGGGACCCCTTTACTTTTCGGGA GCGGGACAAAGCTGGAGATTAAT
42A5-VH	146	DNA	CAGGTCCAGCTTAAAGAGTCCGGACCTGGACTTGTGCAG CCATCCCAGACCTTGTCTTGACCTGCACCGTGTCCAGGG TTCTCTCTCACAGTTACCACCTGCATTGGATCAGGCAGC CTCCCGGCAAGGGGCTGGAATGGATGGGGCTGATGTGGA GAGATGGGGATACATCTTACAACAGCAGGCTGAAGAGCC GGCTGAGCATTACACGGGACACCAGCAAGTCCCAGGTGTT CCTCAAGATGAGCGGGCTCCAACTGAGGACACAGCTACA TACTACTGTGCACGCGGCATGACACTCGCCACTCCCTTTC TGTATTGGGGCCAGGGCACTCTGGTCACTGTGTCCTCA
42A5-CDR-L1	147	DNA	AGAAGCTCCAGTCCTTGGAGAGTAGCGACGGCAACACA TACCTCGAG
42A5-CDR-L2	148	DNA	GGCGTGAGTAACAGGTTTCAGC
42A5-CDR-L3	149	DNA	TTTCAGGCCACTCGGGACCCCTTTACT
42A5-CDR-H1	150	DNA	AGTTACCACCTGCAT

42A5-CDR-H2	151	DNA	CTGATGTGGAGAGATGGGGATACATCTTACAACAGCAGGCTGAAGAGC
42A5-CDR-H3	152	DNA	GGCATGACACTCGCCACTCCCTTTCTGTAT
42A5-VL	153	PRT	DVVLTPGSLSVTLGDPASMSCRSSQSLESSDGNTYLEWYLQKSGQSPQLLIYGVSNRFSGVPDRFAGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATRDPFTFGSGTKLEIN
42A5-VH	154	PRT	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHLHWIRQPPGKGLEWMGLMWRDGDTSYNSRLKSRLSITRDTSKSQVFLKMSGQLQTEDTATYYCARGMTLATPFLYWGGQGLTVTVSS
42A5-CDR-L1	155	PRT	RSSQSLESSDGNTYLE
42A5-CDR-L2	156	PRT	GVSNRFS
42A5-CDR-L3	157	PRT	FQATRDPFT
42A5-CDR-H1	158	PRT	SYHLH
42A5-CDR-H2	159	PRT	LMWRDGDTSYNSRLKS
42A5-CDR-H3	160	PRT	GMTLATPFLY
42F4-VL	161	DNA	GATATCCGGATGACACAGTCGCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAACTGTCAACATCGAATGTCTAGCAAGTGA GGACATTACAGTGATTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCA GGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAATAGCTTGCAAATGGGGTCCCTTCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCT GGCACACAGTATTCTCTAAAAATAACCAGCCTGCAATCTGA AGATGTCGCGACTTATTTCTGTCAACAATATACCAACTATC CGAACACGTTTGGAGCGGGGACCAAGCTGGAAATCAAT
42F4-VH	162	DNA	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAAC CTCACAGTCACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTAC TCCATCACTAATCATTACTGGGGCTGGATCCGGAAATTCC CAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGACACATAAGCAACAG TGGTGGCACTAACTACAACCCATCACTCAAAGTCGAATCT CCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAG TTGAAGTCTGTAAGTACTGAGGACACAGCCACATATTACT GTACAAGAGGATCTTATTACTATAGCGCATCGGGCTACTT TGATTACTGGGGCCAAGGAGTCCTGGTCACAGTCTCCTCC
42F4-CDR-L1	163	DNA	CTAGCAAGTGAGGACATTACAGTGATTTAGCA
42F4-CDR-L2	164	DNA	AATGCAAATAGCTTGCAAAT

42F4-CDR-L3	165	DNA	CAACAATATACCAACTATCCGAACACG
42F4-CDR-H1	166	DNA	AATCATTACTGGGGC
42F4-CDR-H2	167	DNA	CACATAAGCAACAGTGGTGGCACTAACTACAACCCATCAC TCAAAAGT
42F4-CDR-H3	168	DNA	GGATCTTATTACTATAGCGCATCGGGCTACTTTGATTAC
42F4-VL	169	PRT	DIRMTQSPASLSASLGETVNIECLASEDIHSDLA WYQQKPGKSPQQLLIYNANSLQNGVPSRFSGSGSGTQYSLKITS LQSEDVATYFCQQYTNPNTFGAGTKLEIN
42F4-VH	170	PRT	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITNHYWGWIRKFP GNKMEWIGHISNSGGTNYNP SLKSRISITRDTSKNQFFLQLKSVTTEDTATYYCTRGSYYYSASGYFDYWGQGV LTVSS
42F4-CDR-L1	171	PRT	LASEDIHSDLA
42F4-CDR-L2	172	PRT	NANSLQN
42F4-CDR-L3	173	PRT	QQYTNPNT
42F4-CDR-H1	174	PRT	NHYWG
42F4-CDR-H2	175	PRT	HISNSGGTNYNP SLKS
42F4-CDR-H3	176	PRT	GSYYYSASGYFDY
45H1-VL	177	DNA	GATATCCGGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCAT CTCTGGGAGAACTGTCAACATCGGATGTCTAGCAAGTGA GGACATTTACAGTGATTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCA GGGAAGTCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAATAACTT GCAAAATGGGGTCCCTTCACGGTTTAGTGGCAGTGGATCT GGCACACAATATTCTCTAAAAATAAACAGCCTGCAATCTGA AGATGTCGCGACTTATTTCTGTCAACAATATAACAGTTATC CGAACACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
45H1-VH	178	DNA	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAA CCCTCACAGTCACTCTCCCTCATTTGTTCTGTCACTGGTT ACTCCATCACTACAACCTTACTGGGGCTGGATCCGGAAGT TCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGACACATAAGTA ACAGTGGTAGTACTAATTACAACCCATCTCTCAAAGTCG AATCTCCGTTACTAGAGACACATCGACGAATCAGTTCTTC CTGCAGTTGAACTCTGTA ACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGGATCTTATTACTATAGCGCGTCGG GCTACTTTGATTACTGGGGCCACGGAGTCATGGTCACAG TCTCCTCA

45H1-CDR-L1	179	DNA	CTAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGATTTAGCA
45H1-CDR-L2	180	DNA	AATGCAAATAACTTGCAAAAT
45H1-CDR-L3	181	DNA	CAACAATATAACAGTTATCCGAACACG
45H1-CDR-H1	182	DNA	ACAACTTACTGGGGC
45H1-CDR-H2	183	DNA	CACATAAGTAACAGTGGTAGTACTAATTACAACCCATCTC TCAAAAGT
45H1-CDR-H3	184	DNA	GGATCTTATTACTATAGCGCGTCGGGCTACTTTGATTAC
45H1-VL	185	PRT	DIRMTQSPASLSASLGETVNIGCLASEDIYSDLA WYQQKPGKSPQQLLIYNANNLQNGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSED VATYFCQQYNSYPNTFGAGTKLEIK
45H1-VH	186	PRT	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLICSVTGYSITTTYWGWIRKFP GNKMEWIGHISNSGSTNYPNPSLKSRI SVTRDTSTNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARGSY YYSASGYFDYWGHGVMVTVSS
45H1-CDR-L1	187	PRT	LASEDIYSDLA
45H1-CDR-L2	188	PRT	NANNLQN
45H1-CDR-L3	189	PRT	QQYNSYPNT
45H1-CDR-H1	190	PRT	TTYWG
45H1-CDR-H2	191	PRT	HISNSGSTNYPNPSLKS
45H1-CDR-H3	192	PRT	GSYYYSASGYFDY
14E11-VL (controle)	193	PRT	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQK PGQSPKLLIYLTYSYRNTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAE DLAVYYCQQHYKTPYSFGGGTKLERLR
14E11-VH (controle)	194	PRT	QVQLEESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTG YGIYWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGRTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTARYYCARYYGSKDYWGQGTTLTVS
1A6-VL (controle)	195	PRT	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGD SYLNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPAR FSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQ QSNQDPWTFGGGTGLEIK
1A6-VH (controle)	196	PRT	QVTLKESGPGLKPSQTLSTCSFSGFSLSTSG MGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYN PSLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDAAD TATYYCARKRSSVVAHYAMDYWGQGT SVTVS

[0032] São fornecidas em certas realizações anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa

humanizados. São conhecidas várias técnicas no estado da técnica para humanizar anticorpos a partir de espécies não humanas, de tal modo que os anticorpos são modificados para aumentar a sua similaridade com anticorpos que ocorrem naturalmente em humanos. Seis CDRs estão presentes em cada domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo natural. Estas CDRs são sequências curtas, não contínuas, de aminoácidos que estão especificamente posicionadas para formar o domínio de ligação ao antígeno, uma vez que o anticorpo assume a sua configuração tridimensional. O restante dos aminoácidos nos domínios de ligação ao antígeno, referidos como regiões de “estrutura”, mostram menos variabilidade intermolecular e formam uma estrutura para permitir o posicionamento correto das CDRs.

[0033] Por exemplo, a humanização dos anticorpos descritos no presente pode ser realizada por enxerto de CDR de anticorpos monoclonais produzidos por imunização de camundongos ou ratos. As CDRs de um anticorpo monoclonal de camundongo podem ser enxertadas em uma estrutura humana, que é subsequentemente ligada a uma região constante humana para obter um anticorpo humanizado. Resumidamente, o banco de dados de sequência de anticorpos da linhagem germinativa humana, o banco de dados de proteínas (PDB), o banco de dados INN (International Non Proprietary Names) e outros bancos de dados adequados podem ser pesquisados e as estruturas mais semelhantes aos anticorpos podem ser identificadas pela pesquisa. Além disso, algumas mutações posteriores aos resíduos doadores são feitas nas estruturas receptoras humanas. Em algumas realizações, as regiões variáveis são ligadas a uma região constante de IgG humana. Por exemplo, os domínios IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 Fc humanos podem ser utilizados. Está dentro do alcance de um técnico no assunto humanizar um anticorpo monoclonal produzido por uma espécie não humana com base na tecnologia existente.

[0034] As sequências das regiões variáveis de vários exemplos de anticorpos humanizados são mostradas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

Sequências de anticorpos humanizados

Descrição	SEQ ID NO	Tipo	Sequência (com mutações destacadas)
------------------	------------------	-------------	--

h-19F6-VL	197	PRT	QFQLTQPSSVSASVGDRVTITCERSSGDIGDSYVSWYQQ KPGQPPKNVIYADDQRPSGVPDRFSGSIDGSGNSASLTIS SLQAEADAADYFCQSYDSNIDFNPVFGGGTKLEVK
h-19F6-VH	198	PRT	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSKYAMS SWVRQAP GKGLEWVSAINYDGSTTTYADSVKGRFTLSRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARHPFNNFGIWFAYWGQGLTVTS
h-34F8-VL	199	PRT	DVLTQTPLSLPVTPEPASISCRSSQSLESRDGNTYLEWY LQKPGQSPQVLLYGVSNRSLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCFQATHGPFTFGQGTKLEIKRT
h-34F8-VH	200	PRT	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTTYHVVHWRQP PGKGLEWIGIMWRDGDITYNSSLKSRVTISRDTSKNQVS LKSSVTAADTAVYFCARGGTLTPFTYWGQGLTVTVSS
h-42A5-VL	201	PRT	DVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLESSDGNTYLEWY LQKPGQSPQLLIYGVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCFQATRDPTFGQGTKLEIKRT
h-42A5-VH	202	PRT	QVTLKESGPVLVKPTELTLTCTVSGFSLTSYHLHWIRQPP GKALEWMGLMWRDGDTSYNSRLKSRLTISRDTSKSQVVL TMTNMDPVDATYYCARGMTLATPFLYWGQGLTVTVSS

[0035] Os anticorpos fornecidos no presente incluem variantes das sequências descritas no presente que contêm uma ou mais mutações nas suas sequências de aminoácidos enquanto retêm a afinidade de ligação para FXI, FXIa e/ou um fragmento do mesmo (por exemplo, um fragmento compreendendo o domínio A3). Em algumas realizações, os anticorpos incluem uma região variável com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 9, 10, 25, 26, 41, 42, 57, 58, 73, 74, 89, 90, 105, 106, 121, 122, 137, 138, 153, 154, 169, 170, 185, 186 e 197-202, ou um fragmento da mesma que retém a afinidade de ligação para FXI, FXIa e/ou um fragmento do mesmo.

[0036] Também estão incluídos nesta descrição variantes de ácidos nucleicos que codificam anticorpos que se ligam a FXI, FXIa e/ou um fragmento do mesmo (por exemplo, um fragmento compreendendo o domínio A3). Em algumas realizações, os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos incluem uma região variável tendo uma sequência de ácido nucleico

que é pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica a uma sequência selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1, 2, 17, 18, 33, 34, 49, 50, 65, 66, 81, 82, 97, 98, 113, 114, 129, 130, 145, 146, 161, 162, 177 e 178, ou um seu fragmento que codifica um polipeptídeo com afinidade de ligação para FXI, FXIa e/ou um seu fragmento.

Composições Farmacêuticas

[0037] Os anticorpos descritos no presente podem ser formulados em composições farmacêuticas. As composições farmacêuticas podem compreender ainda um ou mais veículos, excipientes, conservantes ou uma combinação farmaceuticamente aceitável dos mesmos. As composições farmacêuticas podem ter várias formulações, por exemplo, formulações injetáveis, formulações liofilizadas, formulações líquidas, etc. Dependendo da formulação e da via de administração, serão selecionados aditivos adequados, tais como adjuvantes, veículos, excipientes, conservantes. Vide, por exemplo, Wang et al., *J. Pharm. Sciences* 96 (1): 1-26 (2007), cujo conteúdo é incorporado por referência.

[0038] A composição farmacêutica pode ser incluída em um kit com uma instrução para usar a composição.

Métodos de Tratamento

[0039] É fornecido no presente um método de tratamento e/ou prevenção de trombose em um sujeito que sofre de trombose e/ou a um alto risco de desenvolvimento de trombose. Também é fornecido um método para inibir a formação de coágulos sanguíneos em um sujeito. Estes métodos implicam administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-FXI e/ou FXIa fornecido no presente para intervir na via intrínseca. Em algumas realizações, estes métodos compreendem a administração de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo anti-FXI e/ou anti-FXIa como fornecido no presente ao sujeito.

[0040] Os métodos descritos no presente podem ser utilizados para prevenir e/ou tratar complicações ou condições associadas à trombose em um sujeito com necessidade disso. A trombose causa ou está associada a uma série de complicações ou condições, como acidente vascular cerebral embólico, trombose venosa, como tromboembolismo venoso (TEV), trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP), trombose arterial, como

síndrome coronariana aguda (SCA), doença arterial coronariana (DAC) e doença arterial periférica (DAP). Outras condições associadas à trombose incluem, por exemplo, alto risco de TEV em pacientes cirúrgicos, pacientes imobilizados, pacientes com câncer, pacientes com insuficiência cardíaca, pacientes grávidas ou pacientes com outras condições médicas que possam causar trombose. Os métodos descritos no presente referem-se a uma terapia anticoagulante preventiva, isto é, trombopprofilaxia. Estes métodos implicam a administração a um sujeito que sofre de uma complicação relacionada com trombose descrita acima de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-FXI e/ou FXIa como descrito no presente ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo anti-FXI e/ou FXIa. O anticorpo ou composição farmacêutica pode ser administrado isoladamente ou em combinação com qualquer outra terapia para tratar ou prevenir as complicações ou condições relacionadas com a trombose.

[0041] Também é fornecido um método de tratamento e/ou prevenção de sepses em um sujeito em necessidade do mesmo. Tentou-se administrar anticoagulantes a pacientes com sepse para melhorar a mortalidade ou a morbidade. No entanto, a tentativa foi mal sucedida devido ao sangramento indesejado causado por anticoagulantes. Os anticorpos descritos no presente podem ser utilizados como terapia secundária em combinação com outros agentes terapêuticos para tratar a sepses, tais como antibióticos.

[0042] Como usado no presente, o termo "sujeito" refere-se a sujeito mamífero, de preferência um humano. Um "sujeito em necessidade do mesmo" refere-se a um sujeito que foi diagnosticado com trombose ou complicações ou condições associadas a trombose, ou está em alto risco de desenvolver trombose ou complicações ou condições associadas a trombose. As frases "sujeito" e "paciente" são usadas de forma intercambiável no presente.

[0043] Os termos "tratar", "tratando" e "tratamento" como usados no presente com relação a uma condição referem-se a aliviar a condição parcialmente ou inteiramente, prevenindo a condição, diminuindo a probabilidade de ocorrência ou recorrência da condição, retardando a progressão ou desenvolvimento da condição, ou eliminar, reduzir ou retardar o desenvolvimento de um ou mais sintomas associados à condição. No que diz respeito a trombose e/ou complicações ou condições associadas a trombose, "tratar" pode referir-se a prevenir ou retardar o crescimento do coágulo sanguíneo existente e/ou prevenir ou

retardar a formação de coágulo sanguíneo. Em algumas realizações, o termo “tratar”, “tratar” ou “tratamento” significa que o sujeito tem um número reduzido ou tamanho de coágulos sanguíneos em comparação com um sujeito sem ser administrado com os anticorpos ou seus fragmentos funcionais. Em algumas realizações, o termo “tratar”, “tratar” ou “tratamento” significa que um ou mais sintomas de trombose e/ou condições ou complicações relacionadas à trombose são aliviados em um sujeito recebendo um anticorpo ou composição farmacêutica como descrito no presente comparando a um sujeito que não recebe tal tratamento.

[0044] Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” de um anticorpo ou composição farmacêutica, como utilizado no presente, é uma quantidade do anticorpo ou composição farmacêutica que produz um efeito terapêutico desejado em um sujeito, tal como tratar e/ou prevenir trombose. Em certas realizações, a quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade do anticorpo ou composição farmacêutica que produz efeito terapêutico máximo. Em outras realizações, a quantidade terapeuticamente eficaz produz um efeito terapêutico que é menor que o efeito terapêutico máximo. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser uma quantidade que produz um efeito terapêutico evitando um ou mais efeitos colaterais associados a uma dosagem que produz efeito terapêutico máximo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz para uma composição particular variará com base em uma variedade de fatores, incluindo mas não limitados às características da composição terapêutica (por exemplo, atividade, farmacocinética, farmacodinâmica e biodisponibilidade), a condição fisiológica do sujeito (por exemplo, idade, peso corporal, sexo, tipo e estágio da doença, histórico médico, condição física geral, responsividade a uma dada dosagem e outras medicações presentes), a natureza de quaisquer veículos, excipientes e conservantes farmacêuticamente aceitáveis na composição, e a via de administração. Um técnico no assunto em arte clínica e farmacológica será capaz de determinar uma quantidade terapeuticamente eficaz através de experimentação de rotina, nomeadamente monitorando a resposta de um sujeito à administração do anticorpo ou da composição farmacêutica e ajustando a dosagem em conformidade. Para orientação adicional, vide, por exemplo, Remington em *The Science and Practice of Pharmacy*, 22ª Edição, Pharmaceutical Press, Londres, 2012, e Goodman & Gilman

em *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12^a Edição, McGraw-Hill, Nova York, NY, 2011., as descrições inteiras dos quais são incorporadas por referência no presente.

[0045] Em algumas realizações, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo descrito no presente está na faixa de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg.

[0046] Está dentro do alcance de um técnico no assunto selecionar uma via de administração adequada, como administração subcutânea, administração intravenosa, administração intramuscular, administração intradérmica, administração intratecal ou administração intraperitoneal. Para tratar um sujeito em necessidade do mesmo, o anticorpo ou a composição farmacêutica pode ser administrada de forma contínua ou intermitente, para uma liberação imediata, liberação controlada ou liberação sustentada. Além disso, o anticorpo ou a composição farmacêutica pode ser administrada três vezes ao dia, duas vezes ao dia ou uma vez ao dia por um período de 3 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas. O anticorpo ou composição farmacêutica pode ser administrado durante um período de tempo pré-determinado. Alternativamente, o anticorpo ou a composição farmacêutica pode ser administrado até que uma referência terapêutica específica seja alcançada. Em certas realizações, os métodos fornecidos no presente incluem uma etapa de avaliar um ou mais parâmetros de referência terapêuticos para determinar se deve continuar a administração do anticorpo ou da composição farmacêutica.

Método de Produção de Anticorpos

[0047] Também são fornecidos neste documento métodos de produção dos anticorpos anti-FXI e/ou anti-FXIa descritos no presente. Em certas realizações, esses métodos envolvem as etapas de clonagem de um ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-FXI e/ou anti-FXIa em um vetor, transformando uma célula hospedeira com o vetor e cultivando a célula hospedeira para expressar o anticorpo. O anticorpo expresso pode ser purificado a partir da célula hospedeira usando qualquer técnica conhecida. Podem ser utilizados vários vetores de expressão como o vetor pTT5 e o vetor pcDNA3, bem como várias linhagens de células hospedeiras, como células CHO (por exemplo, CHO-K1 e ExpiCHO) e células HEK193T.

[0048] Também abrangidos por esta descrição são os anticorpos produzidos pelo método descrito acima. Os anticorpos podem ter sido submetidos a uma ou mais modificações pós-

translacionais.

[0049] Os exemplos a seguir são fornecidos para melhor ilustrar as realizações e não devem ser interpretados como limitando o escopo de qualquer realização reivindicada. Na medida em que materiais específicos são mencionados, é apenas para fins ilustrativos e não se destina a limitar a presente invenção. Um técnico no assunto pode desenvolver meios ou reagentes equivalentes sem o exercício da capacidade inventiva e sem se afastar do escopo da presente invenção. Será entendido que muitas variações podem ser feitas nos procedimentos descritos no presente enquanto ainda permanecem dentro dos limites da presente invenção. É intenção dos inventores que tais variações sejam incluídas dentro do escopo da presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1

Geração e sequenciamento de anticorpos anti-FXI

[0050] Camundongos BALB/c e ratos Wistar foram imunizados com FXI humano, e foram recolhidos esplenócitos dos animais com boa resposta imunológica para a preparação de hibridomas, que foram submetidos a subclonagem por diluição limitante. Doze clones de hibridoma monoclonais expressando os anticorpos anti-FXI desejados 3G12, 5B2, 7C9, 7F1, 13F4, 19F6, 21F12, 34F8, 38E4, 42A5, 42F4 e 45H1 foram obtidos utilizando ELISA de captura e seleção funcional.

[0051] Para determinar as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos da região variável da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH) destes anticorpos, os DNAC que codificam VL e VH foram clonados a partir das células de hibridoma correspondentes por procedimentos convencionais de RT-PCR. As sequências VL e VH de anticorpos exemplares, incluindo as sequências de CDR, são mostradas na Tabela 1.

Exemplo 2

Determinação da atividade anticoagulação no plasma humano utilizando ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e ensaio do tempo de protrombina (PT)

[0052] O ensaio APTT mede a atividade das vias intrínsecas e comuns da coagulação; enquanto o ensaio PT mede a atividade das vias extrínseca e comuns da coagulação. Os

anticorpos testados nestes experimentos foram 19F6, 34F8, 42A5, 1A6 e 14E11. As sequências das regiões variáveis dos anticorpos de controle foram obtidas a partir da Patente US 8.388.959 e do Pedido de Patente US 2013/0171144 e reformatadas para IgG4. Estes anticorpos foram então expressos utilizando o sistema de células ExpiCHO. O plasma humano padrão adquirido da Symens Inc. foi misturado com igual volume de vários anticorpos em várias concentrações de 0 a 400 nM por 5 minutos antes de ser testado em um analisador CA600. No ensaio APTT, 50 µL da mistura de plasma-anticorpo e 25 µL de reagente APTT (SMN 10445709, Symens Inc.) foram misturados a 37°C durante 4 min. Em seguida, foram adicionados 25 µL de solução de CaCl₂ (25 mM, SMN 10446232, Symens Inc.) e foi determinado o tempo para a formação do coágulo. No ensaio PT, misturou-se 50 µL da mistura de plasma-anticorpo com um volume igual de reagente de PT (SMN 10446442, Symens Inc.) a 37°C e determinou-se o tempo até à formação do coágulo.

[0053] Como mostrado na Figura 1, todos os anticorpos testados aumentaram o APTT de uma maneira concentração-dependente a uma concentração relativamente baixa, por exemplo, até 100 nM (ou até 200 nM para 14E11); enquanto que nenhum destes anticorpos teve um efeito significativo no PT (dados não mostrados). Estes resultados indicam que todos os anticorpos testados inibiram a via intrínseca da coagulação, mas não a via extrínseca.

Exemplo 3

Determinação da atividade anticoagulação no plasma de espécies não humanas utilizando ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)

[0054] Os efeitos de vários anticorpos, incluindo 19F6, 34F8 e 42A5, na coagulação foram avaliados no plasma de camundongo, rato e macaco utilizando o mesmo método descrito no Exemplo 2. Nenhum dos anticorpos testados teve qualquer efeito sobre APTT no plasma de camundongo e rato, mas todos eles, a uma concentração relativamente baixa, concentração-dependente, aumentaram o APTT no plasma de macaco como mostrado na Figura 2, indicando que os anticorpos testados tinham atividade cruzada com o macaco FXI/FXIa, mas não com camundongo ou rato FXI/FXIa.

Exemplo 4

Humanização de anticorpos anti-FXI

[0055] O uso de anticorpos monoclonais murinos diretamente como agentes terapêuticos

tem sido dificultado pela meia-vida curta e a eliciação das respostas humanas de anticorpo anti-murino. Uma solução para este problema é humanizar os anticorpos murinos. Alguns anticorpos foram submetidos a humanização por enxerto de CDR. Foram identificadas estruturas receptoras humanas adequadas para ambas VL e VH de cada anticorpo murino e foi introduzido um número variável de mutações reversas nas estruturas humanas selecionadas para manter a estrutura e/ou função do anticorpo resultante. Se a afinidade e função destes anticorpos humanizados não fossem substancialmente inferiores aos anticorpos não modificados correspondentes, os anticorpos modificados seriam considerados humanizados com sucesso. Três sequências VH e VL humanizadas de 19F6, 34F8 e 42A5, descritas como h-19F6, h-34F8 e h-42A5, respectivamente, são mostradas na Tabela 2.

Exemplo 5

Determinação da afinidade de anticorpos anti-FXI para FXI humano

[0056] A afinidade de anticorpos anti-FXI/FXIa para FXI/FXIa foi determinada usando a tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR) realizada no instrumento BIAcore T200. Os anticorpos humanizados foram construídos por ligação das regiões variáveis dos anticorpos descritos no presente ao domínio Fc de IgG4 humana e os recombinantes foram expressos em células CHO. Esses anticorpos foram capturados em um chip sensor Biacore CM5 que foi pré-imobilizado com um anticorpo anti-IgG humano.

[0057] Em seguida, diferentes concentrações do antígeno purificado FXI ou FXIa (0,005 a 1 µg/ml) foram deixadas fluir através do chip CM5 por 180 s para associação com o anticorpo anti-FXI/FXIa, seguido por um período de 1800 s para dissociação. Os dados de ligação foram coletados e a afinidade entre FXI/FXIa e os anticorpos de teste foi analisada utilizando o Software de Avaliação Biacore fornecido pela GE Healthcare. Os sensogramas SPR da ligação de FXI/FXIa a h-19F6, h-34F8 e h-42A5 são mostrados na Figura 3. Conforme mostrado na Figura 3, a resposta (RU) para cada anticorpo tornou-se mais alta com as crescentes concentrações de FXI ou FXIa. As constantes de dissociação (K_D) de h-19F6, h-34F8 e h-42A5 para FXI e FXIa foram calculadas e detalhadas na Tabela 3. As afinidades de cada anticorpo a FXI e FXIa são consideradas as mesmas desde a diferença entre eles são menos do que 10 vezes.

Tabela 3

Valores de K_D dos anticorpos para FXI e FXIa

Anticorpo	K_D (pM)	
	FXI	FXIa
h-19F6	22.2	25.8
h-34F8	19.5	3.85
h-42A5	35.7	8.14

Exemplo 6

Determinação do local de ligação dos anticorpos anti-FXI no FXI

[0058] Os sítios de ligação de 19F6 e 42A5 no FXI foram determinados usando a tecnologia SPR. Resumidamente, o anticorpo humano de captura de IgG foi pré-imobilizado em um chip sensor Biacore CM5 e o h-19F6 ou h-42A5 recombinante foi capturado fluindo através do chip. Uma quantidade igual (15 unidades relativas) de h-19F6 e h-42A5 foi capturada através do ajuste do tempo de fluxo do anticorpo. Em seguida, FXI do tipo selvagem ou FXI quimérico, no qual o domínio da maçã individual foi substituído pelo domínio correspondente da pré-caliceína humana (quimeras FXI/PK) foi autorizado a fluir através do chip por 180 segundos para associação com h-19F6 ou h-42A5, seguido por um período de 1800 segundos para a dissociação. Os dados de ligação foram analisados em um modo cinético de alto desempenho, pois apenas uma concentração de FXI, do tipo selvagem ou quimérico, foi testada no ensaio SPR. Os resultados mostraram que as quimeras ligadas a h-19F6 e h-42A5, bem como quimeras FXI/PK, exceto quando o domínio A3 do FXI foi substituído pelo domínio PK correspondente, indicando que parte ou o epítipo completo de h-19F6 e h-42A5 em FXI está localizado no domínio A3.

Exemplo 7

Neutralização funcional de FXIa pelos anticorpos

[0059] A atividade de FXIa humana foi determinada medindo a clivagem de um substrato cromogênico específico, S-2366 (Diapharma Inc.). Para testar a atividade inibitória dos anticorpos, os anticorpos h-19F6, h-34F8 e h-42A5 foram pré-incubados por 5 minutos à temperatura ambiente com uma concentração final de 5 nM de FXIa em PBS (solução salina tampão fosfato). Em seguida, foi adicionado um volume igual de 1 mM de S-2366 para iniciar a reação de clivagem de FXIa e as mudanças na absorbância a 405 nm foram monitoradas continuamente usando um leitor de placas M5e (Molecular Devices Inc.). Os

dados foram analisados usando o software GraphPad Prism e são mostrados na Figura 4. O K_i aparente calculado para h-19F6, h-34F8 e h-42A5 são 0,67, 2,08 e 1,43 nM, respectivamente. Portanto, todos os três anticorpos testados exibiram efeitos inibitórios satisfatórios no FXIa a uma concentração relativamente baixa.

Exemplo 8

Inibição da ativação de FIX mediada por FXIa pelos anticorpos

[0060] O FIX humano (200 nM) foi incubado com FXIa (5 nM) em PBS com CaCl_2 a 5 mM à temperatura ambiente com IgG controle a 1 μM ou h-19F6 ou h-42A5. Nos intervalos de 0, 15, 30, 45 e 60 min, amostras de 50 μL foram coletadas em tampão de amostra de dodecil sulfato. As amostras foram fracionadas em géis não redutores a 10% e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno. Western blotting foi realizado para determinar os níveis de FIX e FIXa usando IgG de FIX anti-humano de cabra (Affinity Biologicals). Como mostrado na Figura 5, h-19F6 e h-42A5 inibem a formação de FIXa induzida por FXI em comparação com o controle.

Exemplo 9

Avaliação dos efeitos de anticorpos anti-FXI no tempo de coagulação em macacos cynomolgus

[0061] Macacos cynomolgus foram administrados por via intravenosa com doses indicadas de vários anticorpos. O sangue das veias superficiais do membro superior foi coletado na pré-dose e nas 0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a dose, e o plasma citratado foi preparado para a determinação do APTT e PT. No teste APTT, 50 μL de amostra de plasma diluído e 25 μL de reagente APTT (SMN 10445709, Symens Inc.) foram misturados e incubados a 37°C por 4 min. Em seguida, foram adicionados 25 μL de solução de CaCl_2 (25 mM, SMN 10446232, Symens Inc.) e foi determinado o tempo para a formação do coágulo. No teste de PT, 50 μL da amostra de plasma diluído foram misturados com igual volume de reagente de PT (SMN 10446442, Symens Inc.) e incubados a 37°C e foi determinado o tempo para formação do coágulo. Todos os três anticorpos testados demonstraram aumento da APTT dependente da dose, como mostrado na Figura 6 e nenhum deles afetou o TP, como mostrado na Figura 7.

Exemplo 10

Avaliação dos efeitos de anticorpos anti-FXI em modelos de trombose de derivação arteriovenosa (AV) e de sangramento de veias da cauda em macacos cynomolgus

[0062] A trombose e o tempo de sangramento foram avaliados no mesmo animal para doses múltiplas de cada anticorpo testado. Os anticorpos incluídos nesta experiência foram h-34F8, h-19F6 e h42A5. Resumidamente, o tempo de hemorragia e trombose foram avaliados sequencialmente na pré-dose e 30 minutos após cada administração do anticorpo. As avaliações de sangramento/trombose foram realizadas quatro vezes: pré-dose e pós-dose em três níveis crescentes de dose (0,1, 0,3 e 1 mg/kg).

[0063] Para trombose de derivação AV, um dispositivo de derivação contendo um fio de seda pré-pesado de 10 cm de comprimento foi aplicado para conectar a artéria femoral e a cânula venosa femoral, e foi permitido que o sangue fluísse através da derivação por 10 minutos. Em seguida, o fio foi removido da derivação e pesado novamente. O peso do coágulo no fio foi calculado como a diferença do peso do fio antes e após o fluxo sanguíneo.

[0064] Para avaliação do tempo de sangramento, uma seringa de 2 ml foi inserida na veia da cauda dos animais. Quando o volume de sangue na seringa parou de aumentar, o tempo decorrido foi registrado manualmente como o tempo de sangramento.

[0065] Todos os anticorpos reduziram de maneira dose-dependente o peso do trombo, como mostrado na Figura 8, e nenhum deles prolongou o tempo de sangramento da veia da cauda, como mostrado na Figura 9.

Exemplo 11

Avaliação dos efeitos de anticorpos anti-FXI na trombose da artéria induzida por cloreto férrico e no tempo de sangramento do molde em macacos cynomolgus

[0066] Os macacos cynomolgus foram pré-anestesiados com 1,5 mg/kg de Zoletil, intubados e ventilados com um respirador. A anestesia foi mantida com isoflurano. A pressão arterial, a frequência cardíaca e a temperatura corporal foram monitoradas durante todo o procedimento. Os anticorpos testados, incluindo h-34F8, h-19F6 e h-42A5, ou o controle do veículo foram administrados através da veia do membro por injeção 2 horas antes da aplicação do FeCl₃. A artéria femoral esquerda foi exposta e isolada por dissecação romba. Uma sonda de fluxo Doppler foi montada na artéria e o fluxo sanguíneo foi registrado

continuamente. Antes de aplicar FeCl_3 , o fluxo sanguíneo foi medido por pelo menos 5 minutos. Em seguida, dois pedaços de papel de filtro pré-embebidos com FeCl_3 foram aplicados na superfície adventícia do vaso a montante da sonda por 10 minutos. Após a remoção do papel de filtro, o local da aplicação foi lavado com solução salina. O fluxo sanguíneo foi medido continuamente até diminuir para 0. O tempo para 80% de oclusão (fluxo sanguíneo reduzido para 20% do fluxo sanguíneo basal) e o tempo para 100% de oclusão (fluxo sanguíneo reduzido para 0) foram registrados. No mesmo animal, o tempo de sangramento do molde foi avaliado na pré-dose e 1 hora após a dose.

[0067] Os efeitos de todos os três anticorpos na trombose arterial induzida por FeCl_3 foram investigados. Quatro grupos de macacos foram tratados com o controle de veículo, h-34F8, h-19F6 ou h-42A5 por 2 horas, respectivamente, e FeCl_3 foi aplicado na artéria femoral esquerda de cada animal para induzir trombose. A velocidade do fluxo sanguíneo a jusante foi monitorada. O tempo para 80% e 100% de oclusão trombótica no grupo controle do veículo foi de $14,66 \pm 1,30$ min e $18,50 \pm 1,76$ min, respectivamente. O pré-tratamento com 0,3 mg/kg de h-34F8 ou h-42A5 atrasou significativamente o tempo para 80% de oclusão para $59,53 \pm 16,95$ min e $40,80 \pm 7,94$ min, e o tempo para 100% de oclusão para $70,40 \pm 20,76$ min e $50,61 \pm 9,48$ min, respectivamente, como mostrado na Figura 10. Também foi observado prolongamento do tempo para 80% de oclusão ($26,43 \pm 5,72$ min) e para 100% de oclusão ($32,78 \pm 5,09$ min) em macacos tratados com h-19F6, embora não tenha havido estatisticamente diferença significativa quando comparada ao grupo de controle do veículo, como mostrado na Figura 10.

[0068] Os efeitos dos anticorpos na hemostasia foram avaliados em termos de tempo de sangramento do molde. Não foi observada diferença significativa entre a pré-dose e 1 hora após a dose para cada artigo de teste (Figura 11A, 11B e 11C). A alteração do tempo de sangramento após o tratamento com h-34F8, h-19F6 e h-42A5 não foi diferente daquela após o tratamento de controle do veículo (Figura 11D).

[0069] Os efeitos dos anticorpos nos tempos de coagulação *ex vivo* do plasma de macaco foram também avaliados. Como esperado, os tratamentos com 0,3 mg/kg de h-34F8, h-19F6 e h-42A5 prolongaram significativamente o APTT em $3,29 \pm 0,20$, $1,67 \pm 0,09$ e $2,87 \pm 0,10$ vezes, respectivamente, enquanto nenhum aumento no APTT foi observado

tratamento de controlo de veículo, como mostrado na Figura 12A. Além disso, os tratamentos com h-34F8, h-19F6 ou h-42A5 não tiveram efeito na PT, como mostrado na Figura 12B. [0070] Assim, foi inesperadamente verificado que os anticorpos descritos no presente não tiveram quaisquer efeitos adversos de sangramento prolongado enquanto inibiram de forma eficaz a via intrínseca da coagulação.

Reivindicações

1. ANTICORPO ANTI-FXI OU ANTI-FXIa ISOLADO que se liga especificamente ao FXI ou FXIa humano, **caracterizado por** o anticorpo compreender um domínio variável da cadeia leve de imunoglobulina compreendendo três CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 11-13, 27-29, 43-45, 59-61, 75-77, 91-93, 107-109, 123-125, 139-141, 155-157, 171-173 e 187-189, ou um domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina compreendendo três CDRs selecionadas a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 14-16, 30-32, 46-48, 62-64, 78-80, 94-96, 110-112, 126-128, 142-144, 158-160, 174-176 e 190-192, ou uma porção imunologicamente ativa do mesmo.
2. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o anticorpo se ligar especificamente ao domínio A3 do FXI ou FXIa humano.
3. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o anticorpo compreender um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 169 e SEQ ID NO: 185.
4. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o anticorpo compreender um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 74, SEQ ID N 90, SEQ ID N 106, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 170 e SEQ ID NO: 186.
5. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, **caracterizado por** compreender o anticorpo conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
6. USO DO ANTICORPO, conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** ser na fabricação de um medicamento para inibir a formação de coágulos de sangue em um sujeito.
7. USO DO ANTICORPO, conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** ser na fabricação de um medicamento para tratar ou prevenir a sepse.
8. MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO, conforme descrito em

qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** compreender a clonagem de um ácido nucléico que codifica o anticorpo em um vetor de expressão, e a expressão do mesmo em uma célula hospedeira.

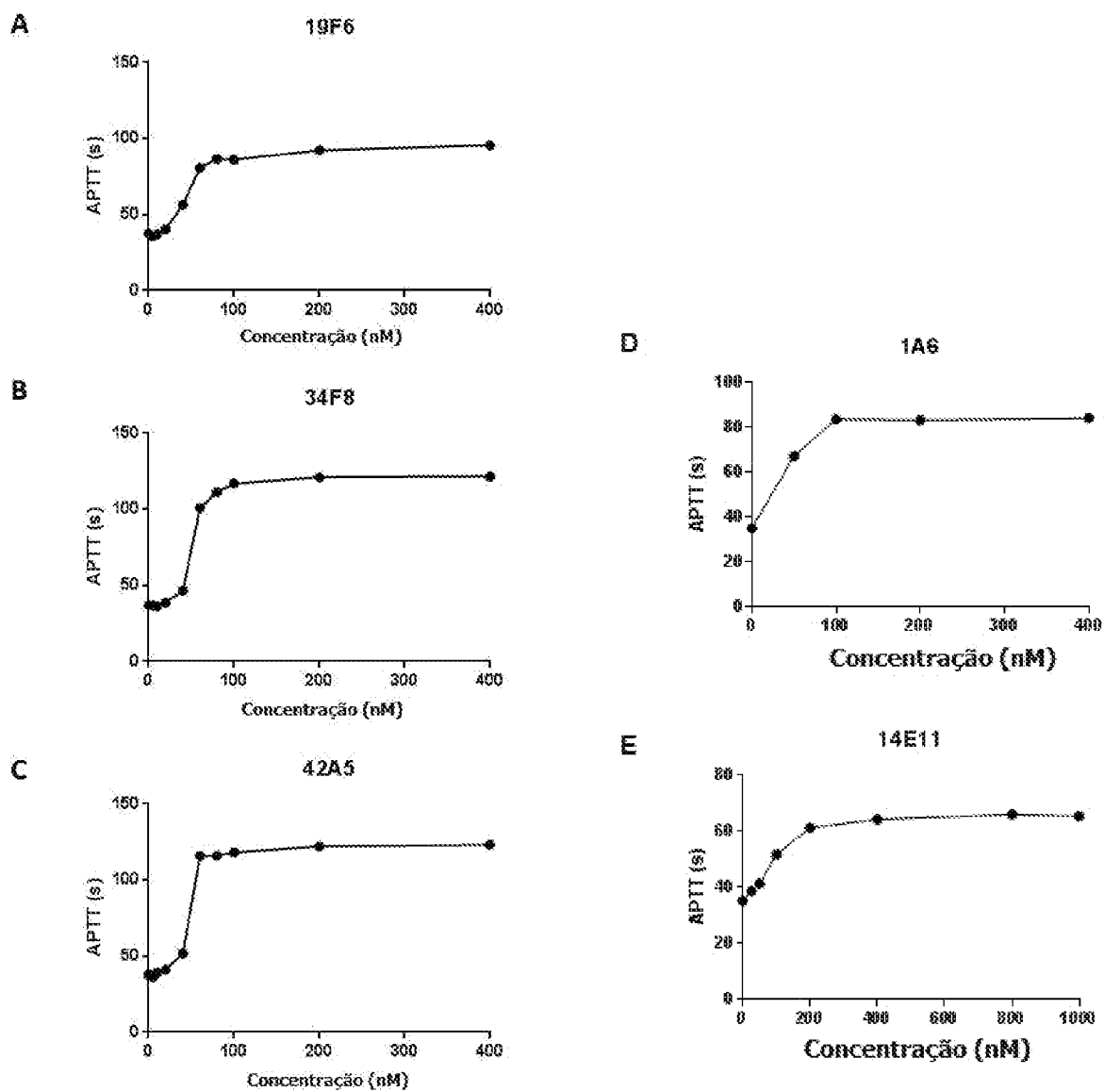
9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** compreender ainda a purificação do anticorpo expresso a partir da célula hospedeira.

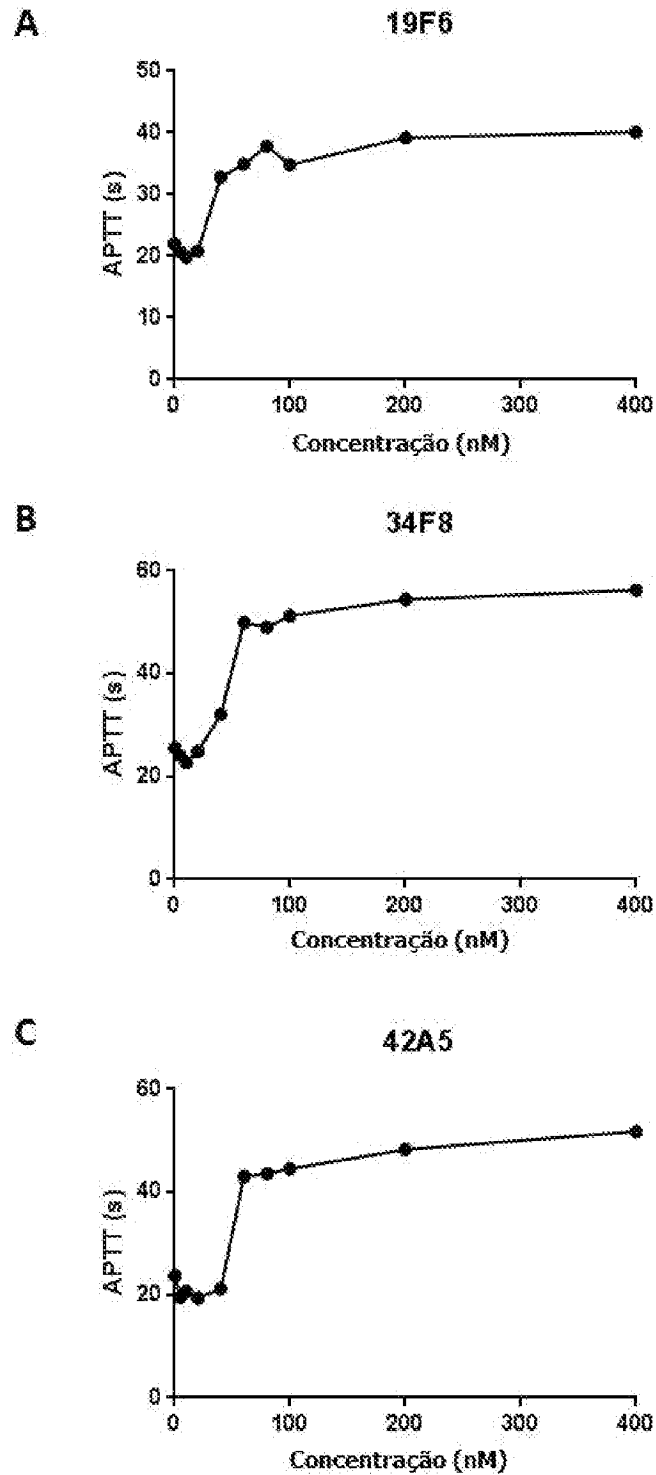
10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** o vetor de expressão ser um vetor pTT5 ou vetor pcDNA3.

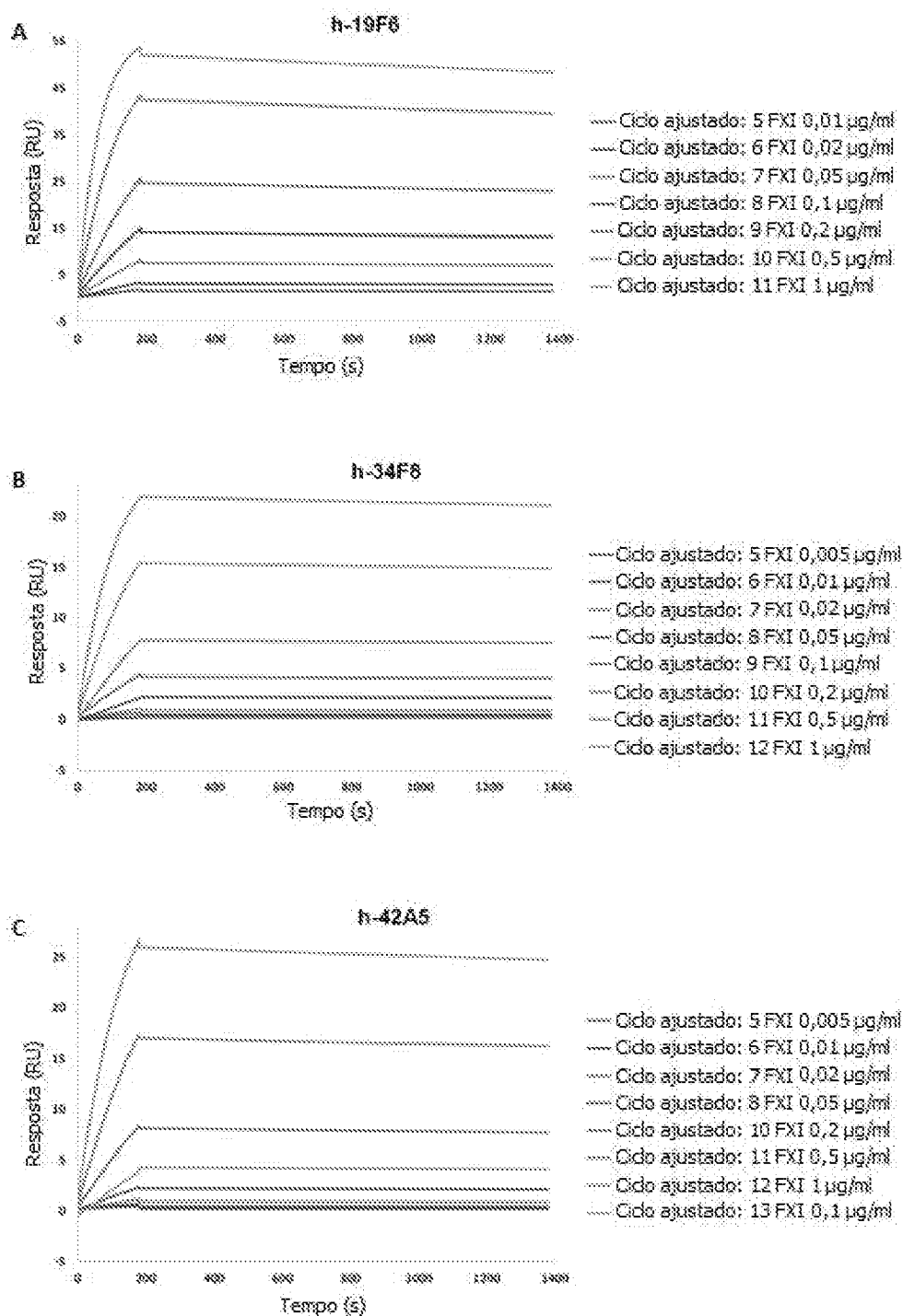
11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** a célula hospedeira ser uma célula CHO ou uma célula HEK193T.

12. ANTICORPO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO OU UMA PORÇÃO IMUNOLOGICAMENTE ATIVA DO MESMO, **caracterizado por** ser produzido pelo método conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 8 a 11.

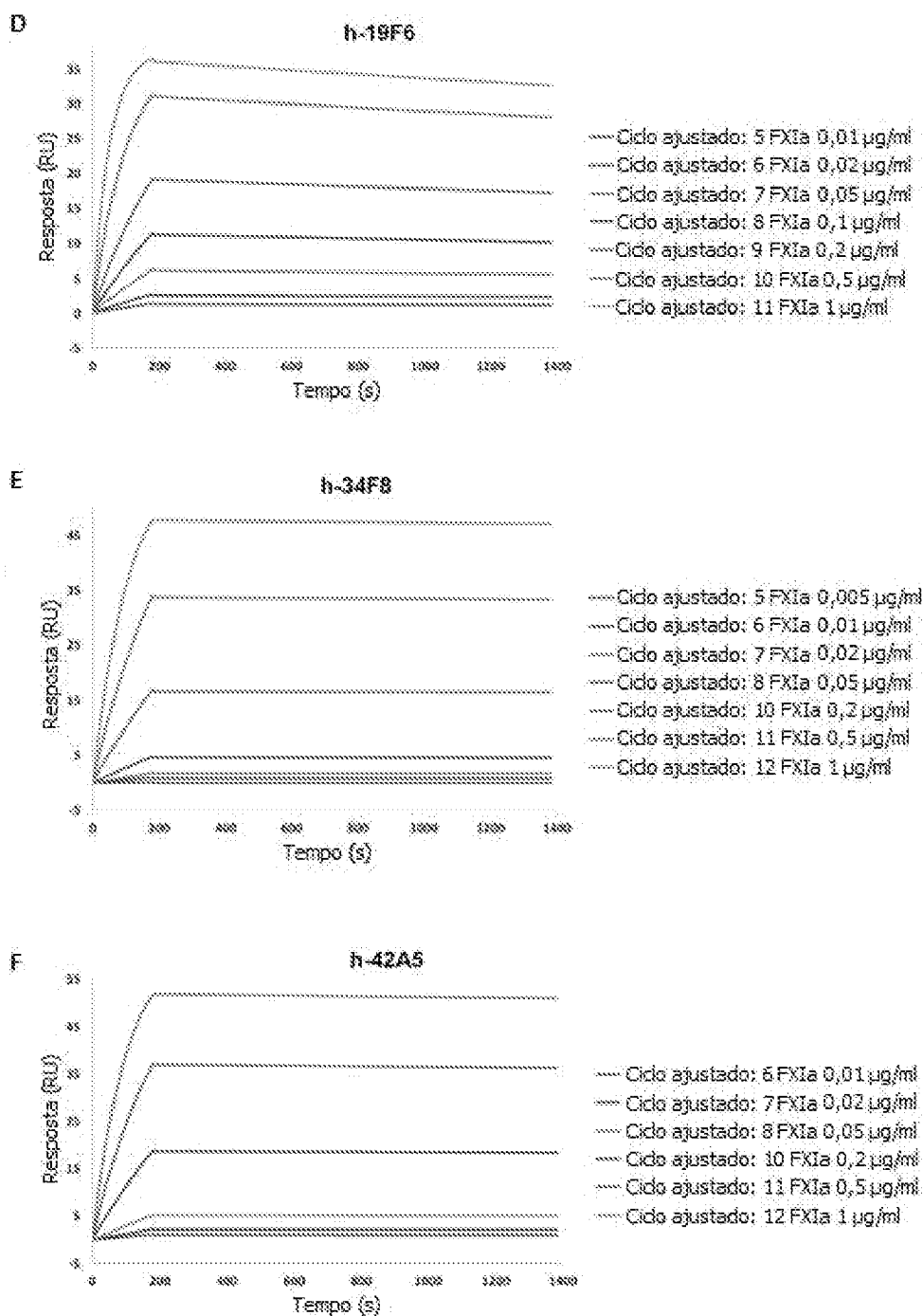
13. ANTICORPO, da reivindicação 12, **caracterizado por** o anticorpo ser modificado de forma pós-translacional.

**Figura 1**

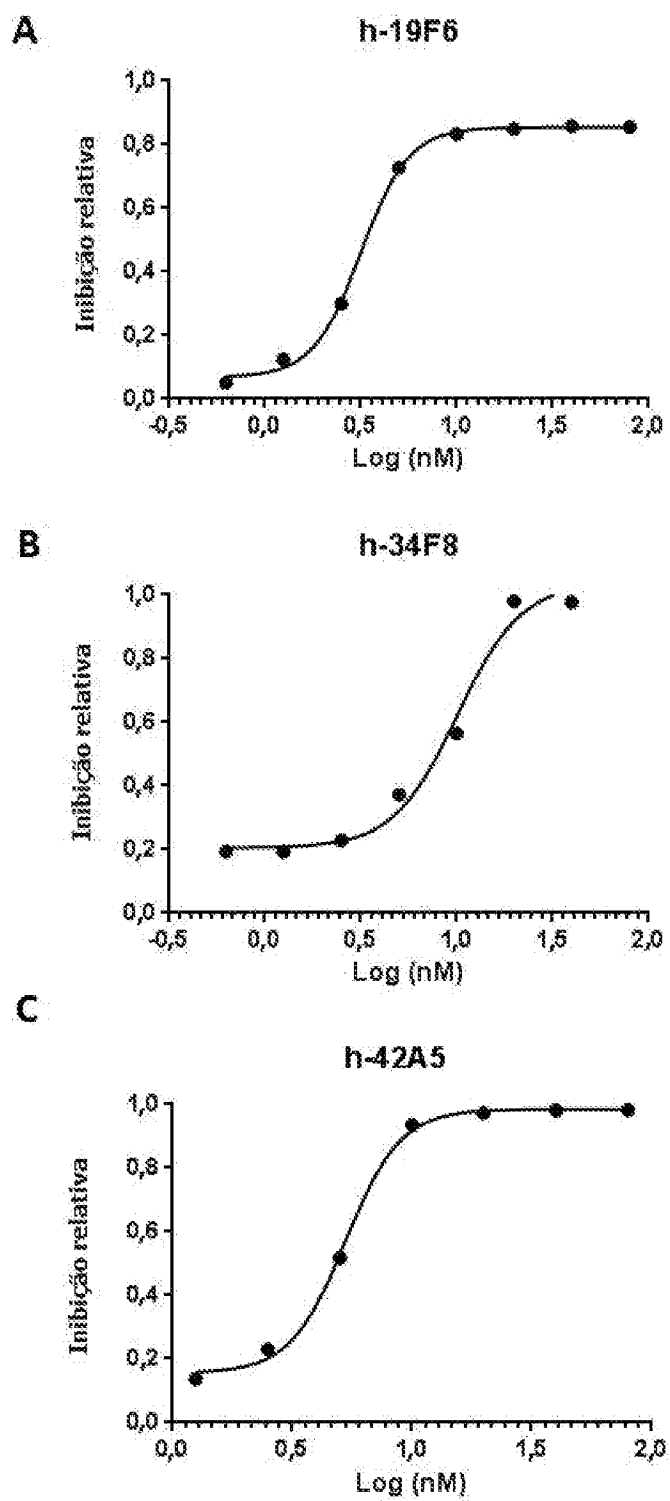
**Figura 2**

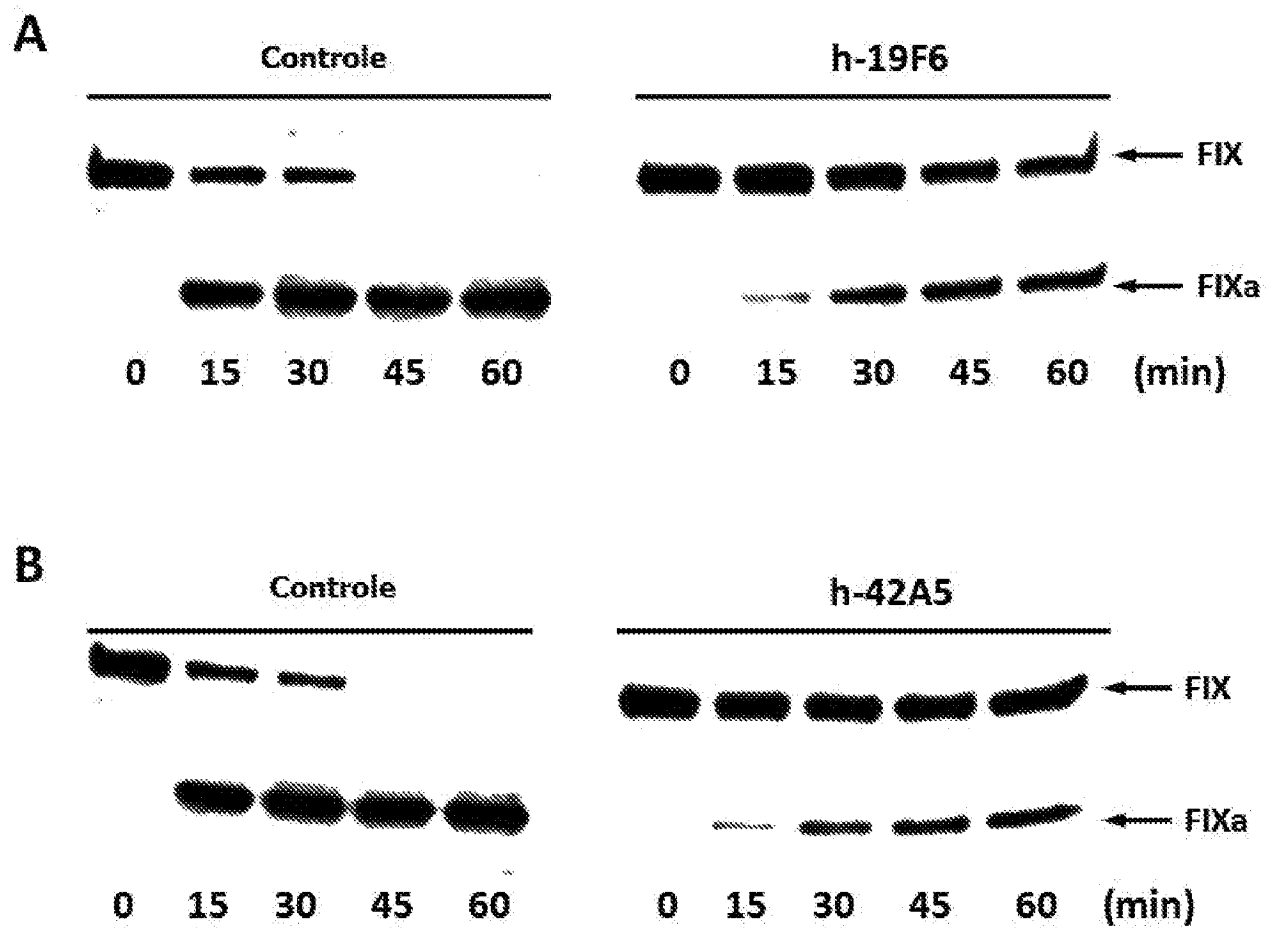


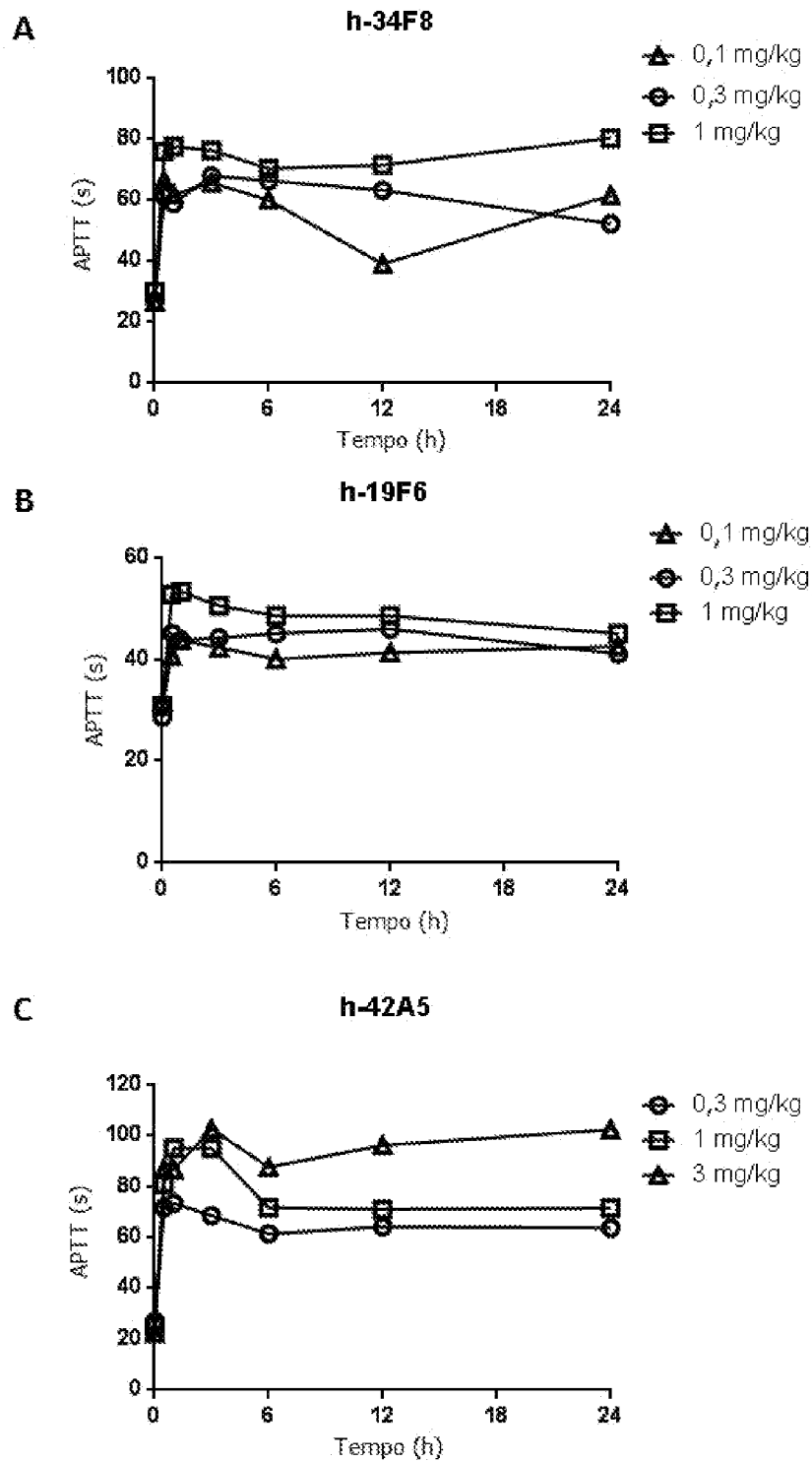
Figuras 3A - 3C

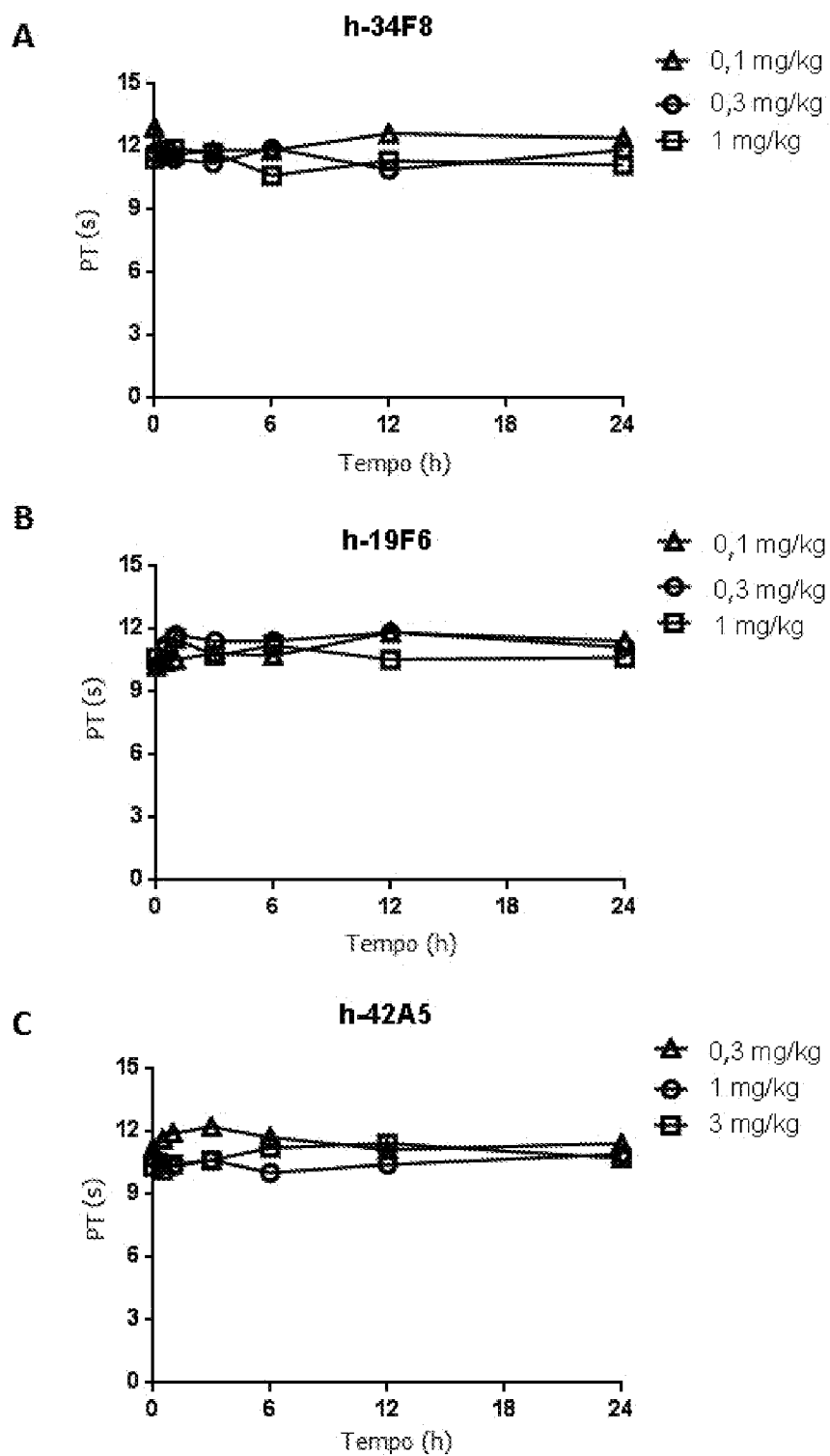


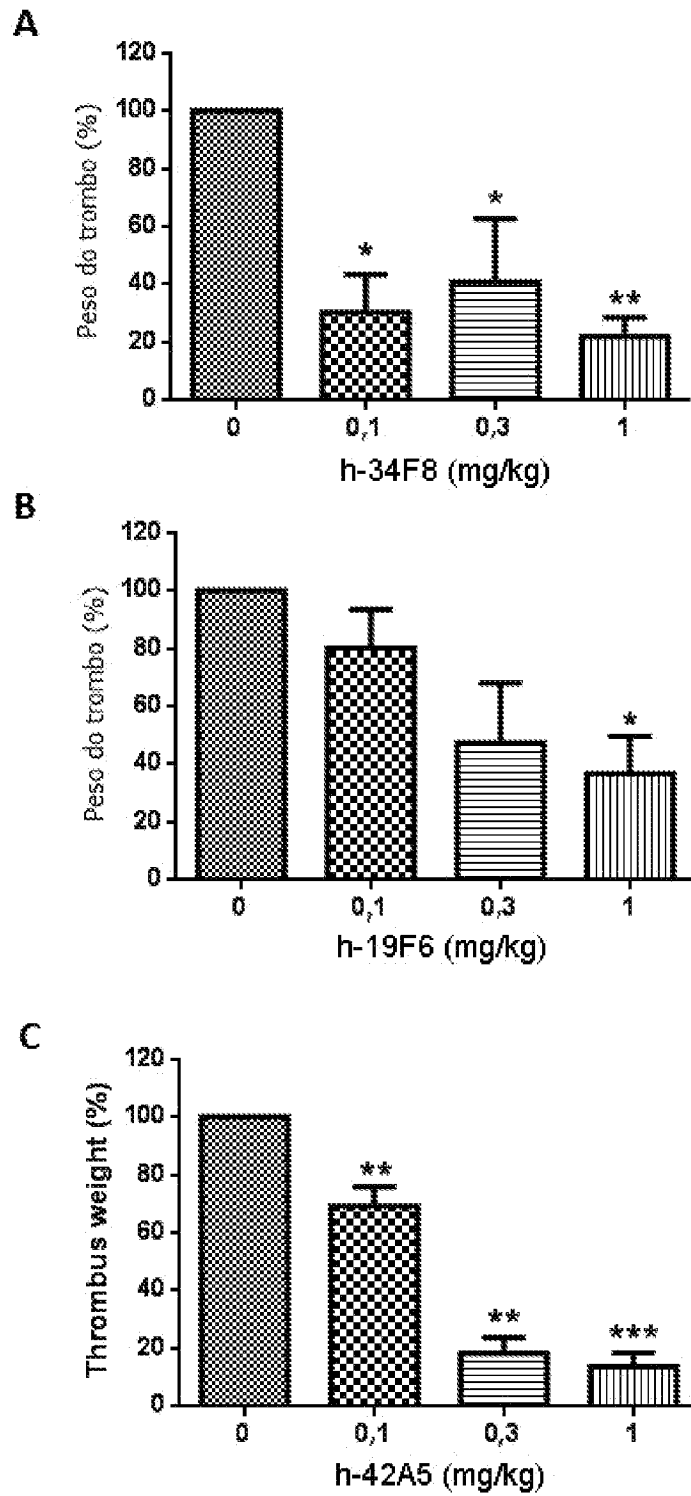
Figuras 3D - 3F

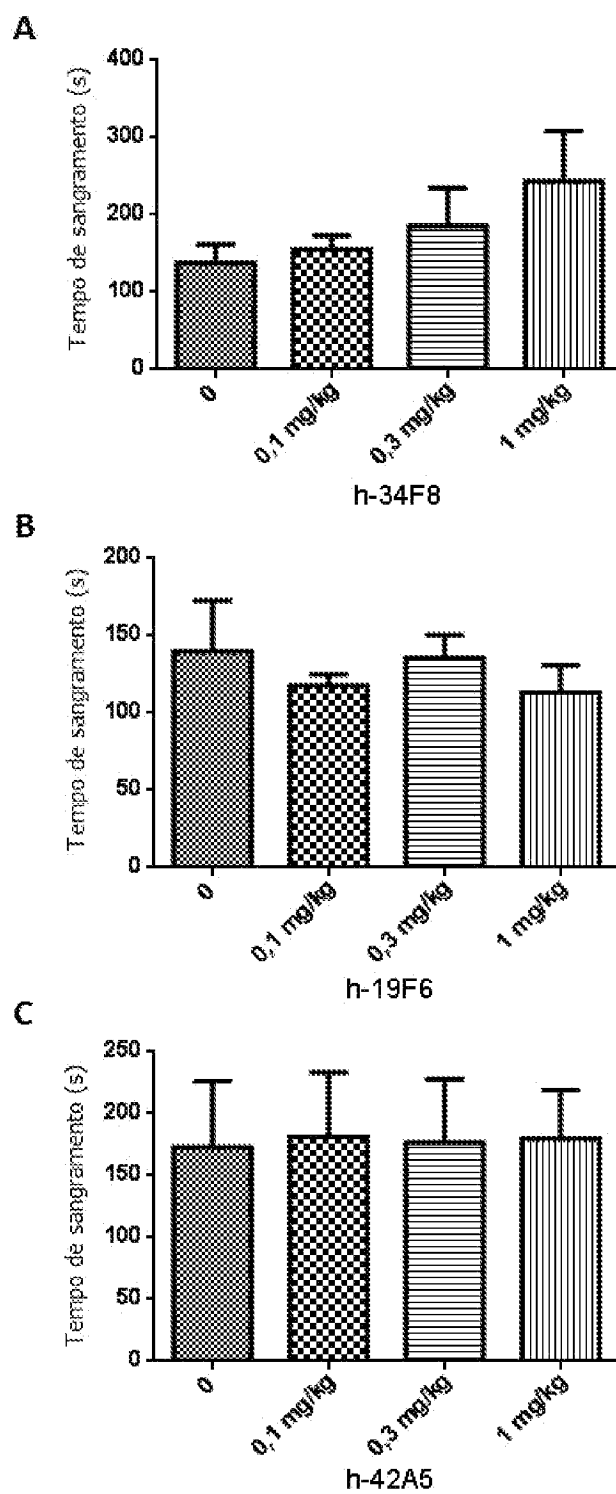
**Figura 4**

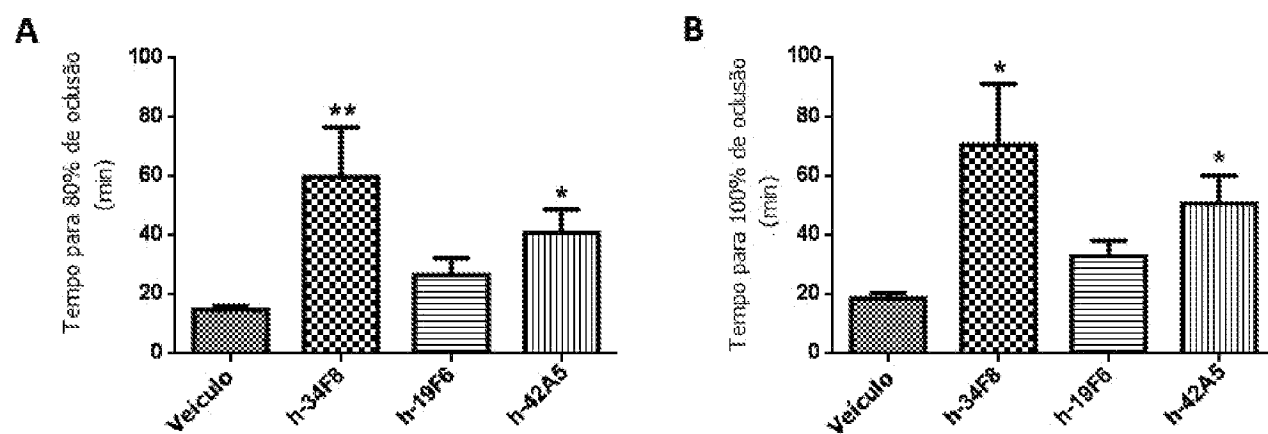
**Figura 5**

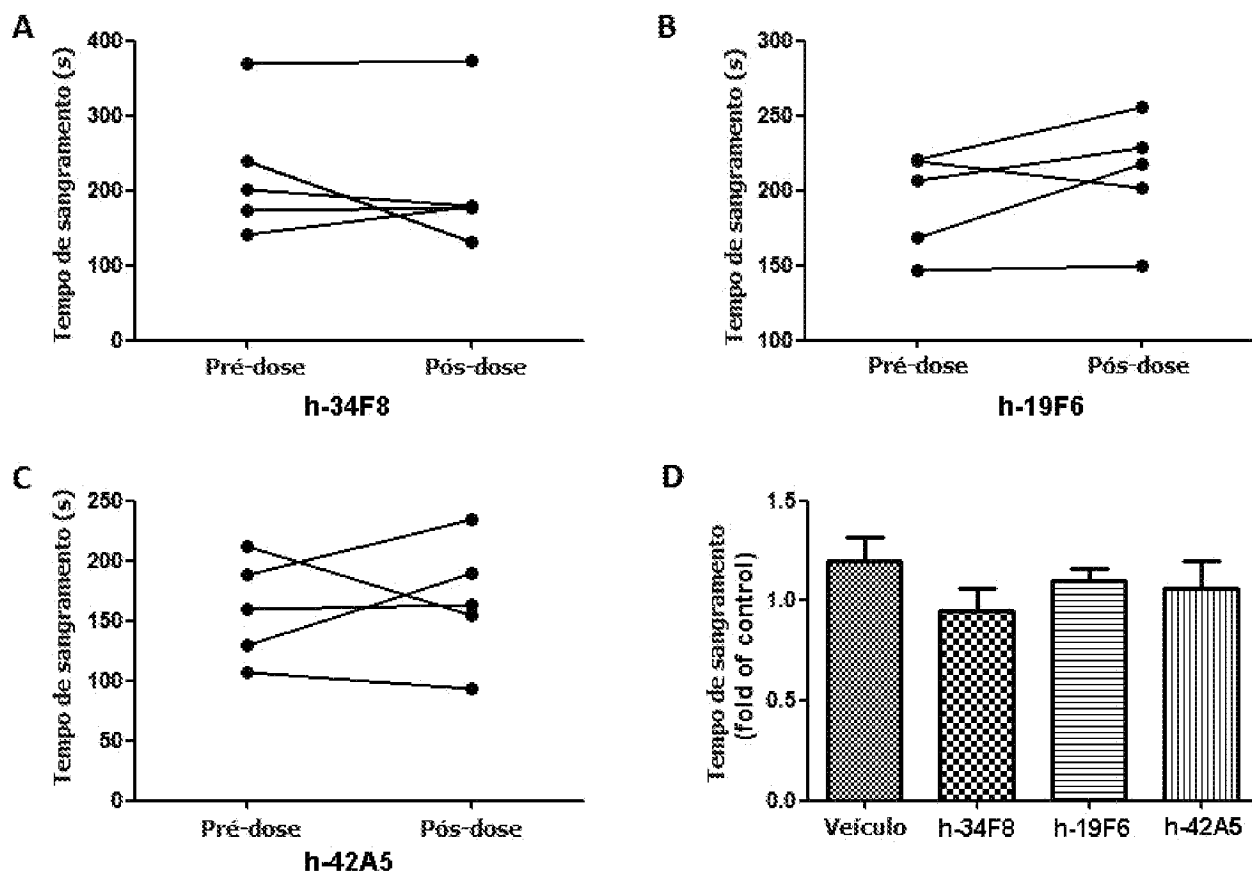
**Figura 6**

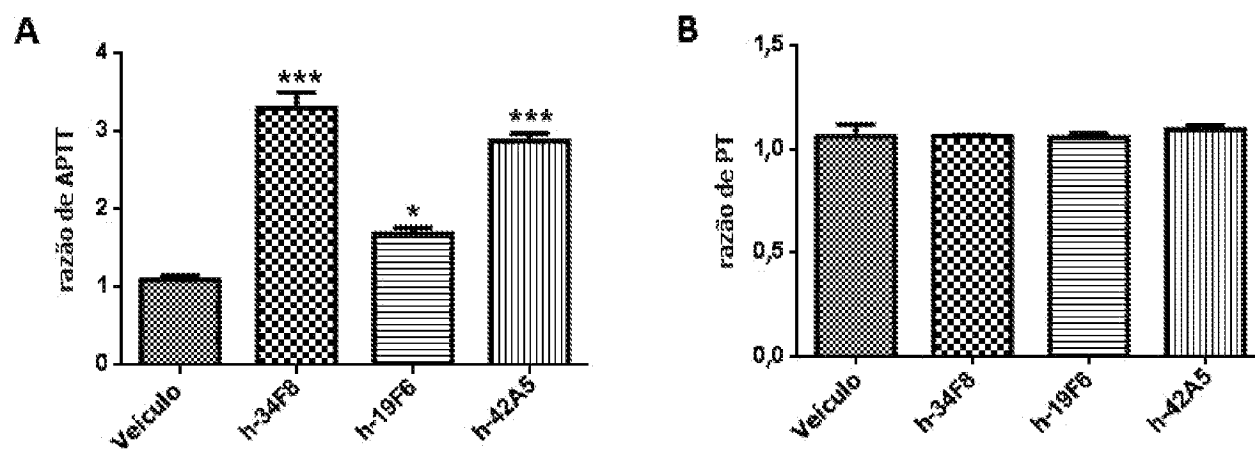
**Figura 7**

**Figura 8**

**Figura 9**

**Figura 10**

**Figura 11**

**Figura 12**

MIFLYQVVHFILETSVSGECVTQLLKDTCFEGGDITTVETPSAKYCQVVCTYHPRCLLET
FTAESPSEDPTRWFCTVLKDSVTETLPRVNRTAALSGYSFKQCSHQISACNKDIYVDLDM
KGINYNSSVAKSAQECQERCTDDVHCHFFTYATRQFPSLEHRNICLLKHTQTGTPTRITK
LDKVVSGLSLKSCALSNLACIRDIFPNTVFADSNIDSVMAPDAFVCGRICTHHPGCLFFT
FFSQEWPKESQRNLCLLKTSEGLPSTRIKKSKALSGFSLQSCRHSIPVFCHSSFYHDTD
FLGEELDIVAAKSHEACQKLCTNAVRCQFFTYTPAQASCNEGKGKCYLKLSSNGSPTKIL
HGRGGISGYTLRLCKMDNECTTKIKPRIVGGTASVRGEWPWQVTLHTTSPTQRHLCGGS I
IGNQWILTAAHCFYGVESPKILRVYSGILNQSEIKEDTSFFGVQEIIIHDQYKMAESGYD
IALLKLETTVNYTDSQRPICLP SKGDRNVIYTD CWVTGWGYRKL RDKIQNTLQKAKIPLV
TNEECQKRYRGHKITHKMICAGYREGGKDACKGDSGGPLSCKHNEVWHLVGITSWGEGCA
QRERPGVYTNVVEYVDWILEKTQAV

Figura 13

Resumo**ANTICORPO ANTI-FXI OU ANTI-FXIa ISOLADO, SEU USO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E ANTICORPO OU UM FRAGMENTO FUNCIONAL DO MESMO OU UMA PORÇÃO IMUNOLOGICAMENTE ATIVA DO MESMO**

A presente invenção refere-se a um anticorpo combinado com o fator de coagulação XI (FXI) e/ou um fator ativado XIa (FXIa) do mesmo, ou um fragmento de FXI e/ou FXIa, e a uma composição compreendendo o anticorpo. A presente invenção refere-se ainda a um método para preparar o anticorpo e ao uso do anticorpo na preparação de medicamentos para o tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas com a coagulação (por exemplo, trombozes e complicações ou doenças relacionadas com trombos).

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 125156_Listagem.TXT
- Data de Geração do Código: 07/08/2019
- Hora de Geração do Código: 10:17:51
- Código de Controle:
 - Campo 1: AEF48E55027F5F38
 - Campo 2: 0135EAC8D45EE438