

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491029 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.12(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)  
C07K 16/36 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2022.10.21

## (54) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕН А2 ФАКТОРА XI, И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 63/270,629

(32) 2021.10.22

(33) US

(86) PCT/US2022/078530

(87) WO 2023/070097 2023.04.27

(88) 2023.06.08

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

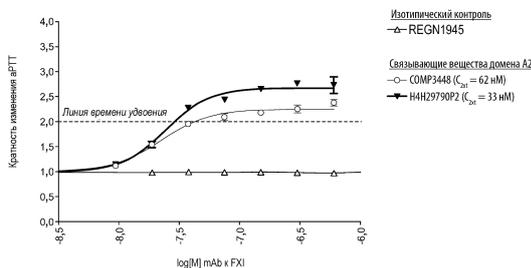
Чалоторн Дэн, Мортон Лори, Лай  
КехДих (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены антитела, которые связываются с доменом А2 фактора XI (FXI), и способы их использования. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела представляют собой антагонистические антитела, которые ингибируют образование сгустков крови посредством внутреннего пути, не влияя на гемостаз, о чем свидетельствует их влияние на продление аРТТ без влияния на РТ. Таким образом, эти антагонистические антитела можно применять для лечения заболеваний или нарушений свертывания крови или режимов лечения, которые имеют образование сгустков в качестве фактора риска, таких как без ограничения фибрилляция предсердий. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитела, которые связывают FXI и опосредуют образование сгустка или тромбогенез. Антитела по настоящему изобретению могут быть полностью человеческими, не встречающимися в природе антителами.

Ответ мAb к FXI/FXIa в зависимости от дозы в отношении аРТТ в плазме крови человека



A1

202491029

202491029

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581073EA/019

### АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕН A2 ФАКТОРА XI, И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

#### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/270629, поданной 22 октября 2021 г., содержание которой явно включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] В настоящей заявке содержится перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате XML и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия XML, созданная 19 октября 2022 г., называется 118003-01020.XML и имеет размер 45437 байт.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с доменом apple 2 (A2) фактора XI (FXI), композициям, содержащим эти антитела, и способам их применения.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Образование сгустков крови (т.е. тромбов) инициируется либо в (a) контактном пути, либо во (b) внешнем пути. Оба пути сходятся в (c) общем пути активации тромбина, который выступает в качестве сериновой протеазы для превращения растворимого фибриногена в нерастворимые нити фибрина. Сшитый фибриновый белок является основным компонентом сгустков крови, наряду с агрегированными тромбоцитами и эритроцитами.

[0005] Внешний путь смягчает гемостаз при повреждении сосудов. В данном случае тканевой фактор (TF), вступивший в контакт с кровью, активирует фактор VII (FVII) с образованием комплекса FVIIa-TF, который активирует фактор X (FX) в общем пути с образованием протромбиназы, которая способствует образованию тромбина и последующему образованию сгустка.

[0006] Контактный путь отличается от внешнего пути тем, что он в меньшей степени участвует в гемостазе, но, тем не менее, влияет на образование сгустков. В данном случае коагуляция инициируется внутренними событиями, такими как высвобождение полифосфата из тромбоцитов или экструзия гистоновых и ДНК-нагруженных нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) из нейтрофилов, которые активируют фактор XII (FXII). Активированный FXII (т.е. FXIIa) дополнительно активирует фактор XI (FXI) с образованием FXIa, что приводит к образованию тромбина по общему пути. Тромбин и тромбоцитарный полифосфат также активируют FXI прямым способом для усиления образования сгустка.

[0007] FXI представляет собой зимоген протеазы FXIa плазмы крови, которая поддерживает образование тромбина посредством активации FIX. FXI представляет собой

дисульфид-связанный гомодимер массой 160 кДа, в котором каждая субъединица состоит из, от N-конца до С-конца, доменов apple A1-A4 и каталитического домена (CD). Дисульфидная связь находится между доменами A4 каждой субъединицы. Субъединицы FXI активируются посредством расщепления одной или обеих связей Arg-Ile, расположенных между доменами A4 и CD, с образованием FXIa. Обычно считается, что расщепление связи Arg-Ile катализируется FXIIa и/или тромбином.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В данном документе представлены выделенные моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются, например, специфично связываются, с доменом A2 фактора XI (FXI). В любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут специфично связываться с доменом A2 FXI. Выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применимы для лечения заболеваний и нарушения, ассоциированных с активностью или экспрессией FXI.

[0009] В самом широком аспекте настоящее изобретение относится к антителам к FXI, которые блокируют активность или активацию FXI и уменьшают образование сгустков крови. Эти антитела можно применять для предупреждения, лечения, снижения частоты или уменьшения отрицательных последствий образования сгустков крови в кровотоке или ткани у пациента, нуждающегося в этом. Предпочтительно антитела к FXI ослабляют тромбоз без нарушения гемостаза.

[0010] В определенных вариантах осуществления антитела к FXI могут быть применимы для лечения различных нарушений свертываемости крови или заболеваний, когда лечение заболевания включает применение антикоагулянтной терапии и когда существует риск кровотечения у пациента вследствие применения антикоагулянтной терапии. Эти показания, нарушения или заболевания включают фибрилляцию предсердий высокого риска, профилактику первичной венозной тромбоземболии (VTE), расширенное лечение VTE, предупреждение рецидивирующей ишемии после острого коронарного синдрома, терминальной стадии почечной недостаточности, медицинские устройства (например, механические клапаны сердца, вспомогательные устройства желудочков, трансплантаты малого калибра, центральные венозные катетеры и т.п.), экстракорпоральные контуры и т.п.

[0011] Антитела по настоящему изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')<sub>2</sub> или scFv) и могут быть модифицированы для воздействия на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

[0012] Иллюстративное антитело к FXI по настоящему изобретению приведено в таблице 1 в данном документе. В таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей и идентификаторы нуклеотидных последовательностей иллюстративных переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей

легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) тиллюстративного антитела к FXI. В таблице 1 также приведены идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты иллюстративных HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративного антитела к FXI.

[0013] В настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0014] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0015] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие HCVR и пару аминокислотных последовательностей LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в таблице 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к FXI, приведенных в таблице 1.

[0016] Соответственно, в первом аспекте в настоящем изобретении представлены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с фактором свертывания крови XI (FXI), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней.

[0017] В одном варианте осуществления антитело к FXI или его

антигенсвязывающий фрагмент проявляют одно или более свойств, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) представляют собой антагонистическое антитело;
- (b) связывают FXI человека со значением  $K_D$  менее чем около 35 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C;
- (c) связывают FXIa человека со значением  $K_D$  менее чем около 765 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C;
- (d) связывают FXI человека с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) более чем около 1000 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C;
- (e) связывают FXIa человека с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) более чем около 23 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C;
- (f) ингибируют активацию фактора Ха (FXa) FXI в нормальной разбавленной плазме крови на по меньшей мере около 85% при IC50 менее около 39 пМ;
- (g) ингибируют активацию фактора Ха (FXa) FXIa в нормальной разбавленной плазме крови на по меньшей мере около 25% при IC50 менее около 10 нМ;
- (h) предпочтительно связываются с доменом PKA2 (т.е., доменом apple 2 или A2) по сравнению с полноразмерными FXI, PKA1, PKA3 и PKA4, как определено с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии;
- (i) конкурируют за связывание с FXI с антителом, которое специфично связывается с эпитопами в домене FXI PKA2 и перекрывается с ним;
- (j) повышают в по меньшей мере два раза активированное частичное тромбопластиновое время (аРТТ), которое является мерой собственного времени свертывания крови, у приматов *in vivo* без измеримого влияния на протромбиновое время (РТ), которое является мерой внешнего времени свертывания крови;
- (k) ингибируют на 5%-15% пиковую активность тромбина внутреннего пути у приматов *in vivo*;
- (l) удлиняют аРТТ в около два раза в плазме крови человека *in vitro* в концентрации около  $\leq 33$  нМ без удвоения РТ; и/или
- m) ингибируют выработку тромбина собственными путями в плазме крови человека *in vitro* в концентрации около  $\geq 31$  нМ без влияния на выработку тромбина внешними путями в дозе до около 500 нМ.

[0018] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают фактор XI (FXI), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: (a) определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, как представлено в таблице 1; и (b) CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, как представлено в таблице 1.

[0019] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают FXI, содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в последовательности HCVR SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 31, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в последовательности LCVR SEQ ID NO: 13, или по сути подобной ей последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней.

[0020] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают FXI, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO:31.

[0021] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают FXI, дополнительно содержат LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

[0022] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают FXI, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO:31; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

[0023] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают FXI, содержат CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 3/13 или SEQ ID NO: 31/13.

[0024] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с ней.

[0025] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с ней.

[0026] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с ней.

[0027] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с ней.

[0028] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с ней.

[0029] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с ней.

[0030] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащих любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, представленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, представленных в таблице 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к FXI, приведенных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 9/19 или SEQ ID NO: 37/19.

[0031] В настоящем изобретении также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FXI, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител к FXI, представленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 5, 7, 9, 15, 17 и 19 или SEQ ID NO: 33, 35, 37, 15, 17 и 19.

[0032] Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе.

Иллюстративные условные обозначения, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариативности последовательностей, определение согласно Chothia основано на расположении структурных петлевых областей, а определение согласно AbM представляет собой компромисс между подходами согласно Kabat и согласно Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

[0033] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают FXI, содержащие:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0034] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) SEQ ID NO: 5-7-9-15-17-19.

[0035] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают FXI, содержащие:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0036] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) SEQ ID NO: 33-35-37-15-17-19.

[0037] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с FXI с эталонным антителом, где эталонное антитело предпочтительно связывается с Apple 2 (A2 или PKA2) FXI.

[0038] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, где эталонное антитело предпочтительно связывается с Apple 2 (A2 или PKA2) FXI.

[0039] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 1000 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0040] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 500 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0041] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 250 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0042] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 100 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0043] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 50 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0044] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 25 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0045] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) более чем около 10 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0046] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $t_{1/2}$  более чем около 20 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0047] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $t_{1/2}$  более чем около 60 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0048] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $t_{1/2}$  более чем около 2 часов, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0049] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $t_{1/2}$  более чем около 5 часов, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

[0050] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают FXI человека с  $t_{1/2}$  более чем около 10 часов,



фактора Ха (FXa) с помощью FXI в нормальной разбавленной сыворотке крови на по меньшей мере около 85% при IC50 менее чем около 39 пМ.

[0064] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, ингибируют активацию фактора Ха (FXa) с помощью FXIa в нормальной разбавленной сыворотке крови на по меньшей мере около 25% при IC50 менее чем около 10 нМ.

[0065] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, предпочтительно связываются с доменом PKA2 (т.е. доменом apple 2 или A2) по сравнению с полноразмерными FXI, PKA1, PKA3 и PKA4, как определено с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии.

[0066] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, конкурируют за связывание с FXI с антителом, которое специфично связывается с эпитопами в FXI PKA2 и перекрывается с ним.

[0067] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, повышают в по меньшей мере два раза активированное частичное тромбопластиновое время (аРТТ), которое является мерой собственного времени свертывания, у примата *in vivo* без измеримого влияния на протромбиновое время (РТ), которое является мерой внешнего времени свертывания.

[0068] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, ингибируют пиковую активность тромбина внутреннего пути у приматов *in vivo* на около 5%-15%, около 1%-20%, около 0,5%-25%, около 3%-5%, около 4%-6%, около 5%-7%, около 6%-8%, около 7%-9%, около 8%-10%, около 9%-11%, около 10%-12%, около 11%-13%, около 12%-14%, около 13%-15%, около 14%-16%, около 15%-17%, около 16%-18%, около 17%-19% или около 18%-20%.

[0069] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, пролонгируют аРТТ в около два раза в плазме крови человека *in vitro* в концентрации около 100 пМ-100 нМ, около 1 нМ-50 нМ, около 5 нМ-40 нМ, около 10 нМ-35 нМ,  $\leq 60$  нМ,  $\leq 55$  нМ,  $\leq 50$  нМ,  $\leq 45$  нМ,  $\leq 40$  нМ,  $\leq 39$  нМ,  $\leq 38$  нМ,  $\leq 37$  нМ,  $\leq 36$  нМ,  $\leq 35$  нМ,  $\leq 34$  нМ,  $\leq 33$  нМ,  $\leq 32$  нМ,  $\leq 31$  нМ,  $\leq 30$  нМ,  $\leq 25$  нМ или  $\leq 20$  нМ. В данном случае антитело к FXI удлинит аРТТ в около два раза без удвоения РТ.

[0070] В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FXI, ингибируют выработку тромбина по внутреннему пути в плазме человека *in vitro* в концентрации около 10 нМ-100 нМ, около 15 нМ-500 нМ, около 20 нМ-60 нМ, около 25 нМ-50 нМ,  $\geq 25$  нМ,  $\geq 26$  нМ,  $\geq 27$  нМ,  $\geq 28$  нМ,  $\geq 29$  нМ,  $\geq 30$  нМ,  $\geq 31$  нМ,  $\geq 32$  нМ,  $\geq 33$  нМ,  $\geq 34$  нМ,  $\geq 35$  нМ,  $\geq 36$  нМ,  $\geq 37$  нМ,  $\geq 38$  нМ,  $\geq 39$  нМ или  $\geq 40$  нМ. В данном случае антитело к FXI ингибирует выработку

тромбина по внутреннему пути без влияния на выработку тромбина по внешнему пути в дозе до около 500 нМ.

[0071] Во втором аспекте настоящего изобретения представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к FXI или их части. Например, в настоящем изобретении представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0072] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0073] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0074] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0075] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, представленных в таблице 1,

или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0076] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0077] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0078] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, представленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0079] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител к FXI, представленных в таблице 1.

[0080] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1, LCDR2, LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1, LCDR2, LCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител к FXI, представленных в таблице 1.

[0081] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR,

представленных в таблице 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в таблице 1. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с последовательности ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, представленных в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней. В определенных вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, и так и LCVR получены из одного и того же антитела к FXI, представленного в таблице 1.

[0082] В третьем аспекте в настоящем изобретении представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к FXI. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 1. В объем настоящего изобретения также включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы продуцирования антител или их частей посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и выделения полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[0083] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело, не содержащее фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для повышения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других вариантах применения модификация галактозилирования может быть выполнена для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[0084] В четвертом аспекте в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связывают FXI, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0085] В связанном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела к FXI и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое

средство, которое предпочтительно комбинируют с антителом к FXI. Второе терапевтическое средство может быть применимо для облегчения по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения.

[0086] В пятом аспекте в настоящем изобретении представлен способ усиления биологической активности, опосредованной FXI, включающий приведение в контакт FXI с биологически эффективным количеством антагонистического антитела к FXI, представленного в таблице 1, или приведение в контакт FXI с фармацевтической композицией, содержащей биологически эффективное количество антагонистического антитела к FXI, представленного в таблице 1.

[0087] В определенных вариантах осуществления биологическая активность представляет собой свертывание крови или свертывание крови в результате внутреннего пути свертывания, а не свертывание крови в результате внешнего пути (т.е. индуцированного тканевым фактором); и свертывание крови или свертывание крови в результате внутреннего пути свертывания, а не свертывание крови в результате внешнего пути ингибируется или иным образом снижается при контакте FXI или FXIa с антагонистическим антителом к FXI.

[0088] В шестом аспекте настоящее в настоящем изобретении представлены терапевтические способы лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с активностью или экспрессией FXI, или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением, с использованием антитела к FXI или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению. Терапевтические способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. Подлежащее лечению нарушение представляет собой любое заболевание или патологическое состояние, которое регрессирует, нормализуется, ингибируется или предупреждается путем нацеливания на FXI и/или инактивации FXI-опосредованного свертывания крови.

[0089] В одном варианте осуществления антитела к FXI по настоящему изобретению могут обеспечивать способ лечения патологического внутреннего свертывания крови без неблагоприятного влияния на гемостаз. В одном варианте осуществления антитела к FXI по настоящему изобретению могут обеспечивать способ лечения заболеваний, нарушений, побочных эффектов свертывания, не прямых эффектов свертывания любого из фактора V Лейдена, мутации гена протромбина, дефицитов природных белков, которые предупреждают свертывание (таких как антитромбин, белок C и белок S), повышенных уровней гомоцистеина, повышенных уровней фибриногена или дисфункционального фибриногена (дисфибриногенемия), повышенных уровней фактора VIII, фактора IX и/или XI, аномальной фибринолитической системы, включая гипоплазминогенемия, дисплазминогенемия и повышение уровней ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), фибрилляции предсердий, рака, побочных эффектов некоторых лекарственных средств,

применяемых для лечения рака, таких как тамоксифен, бевацизумаб, талидомид и леналидомид, недавнюю травму или операцию, установку центрального венозного катетера, ожирение, беременность, дополнительное применение эстрогенов, включая оральные контрацептивы (противозачаточные таблетки), заместительную гормональную терапию, длительный постельный режим или неподвижность, сердечный приступ, застойную сердечную недостаточность, инсульт и другие заболевания, которые приводят к снижению активности, гепарин-индуцированной тромбоцитопении (снижение количества тромбоцитов в крови вследствие применения гепарина или низкомолекулярных препаратов гепарина), длительное путешествие в самолете, синдром антифосфолипидных антител, тромбоз глубоких вен или легочной эмболии, миелопролиферативных нарушений, таких как истинная полицитемия или эссенциальный тромбоцитоз, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, синдром воспалительного кишечника, ВИЧ/СПИД, нефротический синдром, инфекция COVID-19 или эффекты иммунизации спайк-белком и т.п.

[0090] В седьмом аспекте настоящего изобретения представлен способ предупреждения тромбоза у субъекта без неблагоприятного воздействия на гемостаз, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антагонистического антитела к FXI из таблицы 1 или фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0091] В одном варианте осуществления способы, описанные выше, могут быть достигнуты путем введения антагонистического антитела к FXI или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом, где антагонистическое антитело к FXI содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, или по сути подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в таблице 1, или по сути подобную последовательность с ней, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней.

[0092] В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению могут быть достигнуты путем введения антагонистического антитела FXI по настоящему изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в последовательности HCVR SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 31, или по сути подобной ей последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в последовательности LCVR SEQ ID NO: 13, или по сути подобной ей последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность последовательности с ней.

[0093] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 31.

[0094] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

[0095] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

[0096] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 3/13 или SEQ ID NO: 31/13.

[0097] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 3/13 или SEQ ID NO: 31/13.

[0098] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0099] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7-9-15-17-19.

[00100] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[00101] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат набор из шести CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33-35-37-15-17-19.

[00102] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент специфично связывают FXI человека.

[00103] В одном варианте осуществления заболевание или нарушение, подлежащие лечению антителом к FXI по настоящему изобретению, представляют собой тромбоз и любое осложнение, возникающее в результате тромбоза.

[00104] Предполагается, что любое заболевание или нарушение, ассоциированное с активностью или экспрессией FXI, поддаются лечению антителом по настоящему изобретению. Эти нарушения могут включать любое заболевание или состояние, при котором опасное образование сгустков представляет риск, особенно, но без ограничения те состояния, при которых внутренняя свертываемость крови и гемостаз представляют риск для пациента.

[00105] Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00106] На **фиг. 1** изображен линейный график, демонстрирующий кратность изменения aPTT в зависимости от логарифмической концентрации антитела. Заштрихованные пирамиды изображают либо антитело изотипического контроля (вершина вверх), либо антитело FXI A2 по настоящему изобретению, REGN9933 (вершина вниз, обозначенное как H4H29790P2). Заштрихованные кружки изображают антитело сравнения, которое связывает FXI A2.

[00107] На **фиг. 2** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина в зависимости от концентрации антитела изотипического контроля (REGN1945) в динамике.

[00108] На **фиг. 3** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина в зависимости от концентрации рассматриваемого антитела (REGN9933), которое связывает FXI A2 в динамике.

[00109] На **фиг. 4** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина в зависимости от концентрации антитела сравнения (COMP3448), которое связывает FXI A2 в динамике.

[00110] На **фиг. 5** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина в зависимости от концентрации антитела изотипического контроля (REGN1945) в динамике.

[00111] На **фиг. 6** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина в зависимости от концентрации рассматриваемого антитела (REGN9933), которое связывает FXI A2 в динамике.

[00112] На **фиг. 7** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина в зависимости от концентрации антитела сравнения (COMP3448), которое связывает FXI A2 в динамике.

[00113] На **фиг. 8A** изображен линейный график, демонстрирующий кратность изменения активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT) в зависимости от логарифмической концентрации антитела. Темная штриховка означает

изотипический контроль. Светлая штриховка означает рассматриваемое антитело, REGN9933, которое связывает FXI A2. В анализе свертывания на основе aPTT донорскую плазму крови человека инкубировали с 2-кратными серийными разведениями либо REGN9933, либо изотипического контроля IgG4P от 19 нМ до 1200 нМ с последующим добавлением эллаговой кислоты (EA), специфического активатора внутреннего пути коагуляции. На **фиг. 8В** изображен линейный график, демонстрирующий кратность изменения протромбинового времени (PT) в зависимости от логарифмической концентрации антитела. В анализе свертывания на основе PT донорскую плазму человека инкубировали с изотипическим контролем REGN9933 или IgG4P при 600 нМ и 1200 нМ с последующим добавлением тканевого фактора (TF), специфического активатора внешнего пути коагуляции. На **фиг. 8В** изображены перекрывающиеся линии для REGN9933 и изотипического контроля IgG4P для анализа свертывания на основе PT; поэтому эти линии нельзя различить. Определяли изменения aPTT и PT по сравнению с исходным уровнем (т.е. контроль без антител); среднее изменение повторных образцов наносили на график для каждой тестируемой концентрации антител.

[00114] На **фиг. 9А** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина, опосредованную эллаговой кислотой (EA), в зависимости от концентрации рассматриваемого антитела, которое связывает FXI A2 в динамике. На **фиг. 9В** изображен линейный график, демонстрирующий опосредованную EA активность тромбина в зависимости от концентрации антитела изотипического контроля в динамике. На **фиг. 9С** изображен линейный график, демонстрирующий активность тромбина, опосредованную тканевым фактором (TF), в зависимости от концентрации рассматриваемого антитела, REGN9933, которое связывает FXI A2 в динамике. На **фиг. 9Д** изображен линейный график, демонстрирующий опосредованную TF активность тромбина в зависимости от концентрации антитела изотипического контроля в динамике. Плазму крови донора-человека инкубировали с 2-кратными серийными разведениями либо mAb субъекта, либо изотипического контроля IgG4P от 16 нМ до 500 нМ с последующим добавлением (**фиг. 9А и 9В**) эллаговой кислоты (EA), специфического активатора внутреннего пути коагуляции или (**фиг. 9В и 9С**) тканевого фактора (TF), специфического активатора внешнего пути коагуляции. Измеряемые значения концентрации тромбина в реальном времени наносили на график в зависимости от времени для получения профиля тромбограммы для каждой тестируемой концентрации антитела, а также контроля без антитела (т.е. PBS).

[00115] На **фиг. 10А-10В** REGN9933 ассоциировано с повышением общих уровней FXI в плазме крови. Самкам яванских макаков вводили однократную внутривенную (IV) медленную болюсную инъекцию несущей среды (контроль, n=3), 1 мг/кг REGN9933 (n=3), 3 мг/кг REGN9933 (n=3) или 10 мг/кг REGN9933 (n=3) и контролировали в течение 8 недель после введения дозы. Образцы крови собирали у всех животных до введения дозы и через 5 минут, 6 часов, в день 2, день 3, день 4, день 6, день 8, день 11, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50 и день 57 после введения дозы. Измерения перед введением дозы служили исходным уровнем для каждого животного (**фиг. 10А и 10В**). На **фиг. 10А**

изображен линейный график, демонстрирующий общее содержание REGN9933 в сыворотке крови, измеряемое в иммуноферментном анализе (ELISA) с использованием мышинового моноклонального антитела (mAb) к Fc IgG человека. На **фиг. 10 Pharm sum** в 2.1.1 изображает линейный график, показывающий общее количество FXI в плазме крови, измеряемое с помощью ELISA с использованием козьего mAb к FXI человека; сообщаются кратные изменения общего количества FXI (по сравнению с исходным уровнем). Данные выражали как среднее группы  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM).

[00116] На **фиг. 11A-11B** REGN9933 продлевает aPTT, но не PT, при этом имеет место дозозависимое влияние на продолжительность. Самкам яванских макаков вводили однократную внутривенную (IV) медленную болюсную инъекцию несущей среды (контроль, n=3), 1 мг/кг REGN9933 (n=3), 3 мг/кг REGN9933 (n=3) или 10 мг/кг REGN9933 (n=3) и контролировали в течение 8 недель после введения дозы. Образцы крови собирали у всех животных до введения дозы и через 5 минут, 6 часов, в день 2, день 3, день 4, день 6, день 8, день 11, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50 и день 57 после введения дозы. Измерения перед введением дозы служили исходным уровнем для каждого животного. (**Фиг. 11A** и **11B**). На **фиг. 11A** изображен линейный график, демонстрирующий опосредованное EA aPTT как функцию кратности изменения aPTT (по сравнению с исходным уровнем) в динамике. На **фиг. 11B** изображен линейный график, демонстрирующий опосредованное TF PT как функцию кратности изменения PT (по сравнению с исходным уровнем) в динамике. Данные выражали как среднее группы  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM).

[00117] На **фиг. 12A-12B** REGN9933 снижает эндогенный потенциал тромбина внутреннего и внешнего путей коагуляции с дозозависимым эффектом на продолжительность активности внутреннего пути. Самкам яванских макаков вводили однократную внутривенную (IV) медленную болюсную инъекцию несущей среды (контроль, n=3), 1 мг/кг REGN9933 (n=3), 3 мг/кг REGN9933 (n=3) или 10 мг/кг REGN9933 (n=3) и контролировали в течение 8 недель после введения дозы. Образцы крови собирали у всех животных до введения дозы и через 5 минут, 6 часов, в день 2, день 3, день 4, день 6, день 8, день 11, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50 и день 57 после введения дозы. Измерения перед введением дозы служили исходным уровнем для каждого животного. Анализы образования тромбина (TGA) проводили с образцами плазмы крови с использованием эллаговой кислоты (EA) и тканевого фактора (TF) в качестве активаторов внутренних и внешних путей коагуляции соответственно (**фиг. 12A** и **12B**). На **фиг. 12A** изображен линейный график, демонстрирующий опосредованный EA aPTT как функцию кратности изменения эндогенного потенциала тромбина (ETP) (по сравнению с исходным уровнем) в динамике. На **фиг. 12B** изображен линейный график, демонстрирующий опосредованное TF PT как функцию кратности изменения ETP (по сравнению с исходным уровнем) в динамике. Данные выражали как среднее группы  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00118] Прежде чем описывать настоящее изобретение, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными, способами и условиями эксперимента, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что терминология, используемая в данном документе, применяется только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[00119] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемый в данном документе термин «около», при использовании в отношении конкретного указанного числового значения, означает, что значение может отличаться от указанного значения на не более чем 1%. Например, используемое в данном документе выражение «около 100» включает 99 и 101 и все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[00120] Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, в настоящее время описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Определения

[00121] Выражение « FXI» и тому подобное, также известное как «фактор свертывания крови XI» или «фактор XI», относится к сериновой протеазе плазмы крови человека (если не указано иное), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в аминокислотных остатках 19-625 под регистрационным номером NP\_000119.1 (SEQ ID NO: 21). FXI человека, содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, показан как SEQ ID NO: 22 (где аминокислотные остатки 1-607 представляют собой FXI человека, а аминокислотные остатки 608-635 представляют собой тус-тус-гексагистидиновую метку).

[00122] В определенных случаях получали клеточные линии, которые экспрессировали белки FXI, субъединицы белка FXI и белки химеры, содержащие одну или более субъединиц FXI, последовательности меток и последовательности белка калликреина в плазме крови. Например, SEQ ID NO: 23 (конструкция hFXI\_PKA1) представляет собой химеру, содержащую в аминокислотах 1-85 домен apple 1 (PKA1) калликреина В1 человека (аминокислоты G20-C104 калликреина В1 человека [SEQ ID NO: 28]), в аминокислотах 86-606 аминокислотах H105-V625 FXI человека (hFXI) и в аминокислотах 607-634 тус-тус-гексагистидиновую метку.

[00123] Например, SEQ ID NO: 24 (конструкция hFXI\_PKA2) представляет собой химеру, содержащую в аминокислотах 1-90 аминокислоты E19-S108 hFXI, в аминокислотах 91-174 домен apple 2 (PKA2, также обозначаемый «A2») hKLKB1 (аминокислоты C111-

C193 SEQ ID NO: 28), в аминокислотах 175-605 аминокислоты A195-V625 hFXI и в аминокислотах 606-633 мус-мус-гексагистидиновую метку.

[00124] Например, SEQ ID NO: 25 (конструкция hFXI\_РКА3) представляет собой химеру, содержащую в аминокислотах 1-180 аминокислоты E19-L198 hFXI, в аминокислотах 181-264 домен apple 3 (РКА3) hKLB1 (аминокислоты C201-C284 SEQ ID NO: 28), в аминокислотах 265-605 аминокислоты H285-V625 hFXI и в аминокислотах 606-633 мус-мус-гексагистидиновую метку.

[00125] Например, SEQ ID NO: 26 (конструкция hFXI\_РКА4) представляет собой химеру, содержащую в аминокислотах 1-271 аминокислоты E19-V289 hFXI, в аминокислотах 272-355 домен apple 4 (РКА4) hKLB1 (аминокислоты C292-C375 SEQ ID NO: 28), в аминокислотах 356-605 аминокислоты M376-V625 hFXI и в аминокислотах 606-633 мус-мус-гексагистидиновую метку.

[00126] Например, SEQ ID NO: 27 (конструкция hKLB1.mmh) представляет собой химеру, содержащую в аминокислотах 1-619 аминокислоты G20-A638 hKLB1 и в аминокислотах 620-647 мус-мус-гексагистидиновую метку.

[00127] Используемое в данном документе выражение «антитело к FXI» включает как моновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает FXI, и второе плечо, которое связывает второй (целевой) антиген, где плечо к FXI содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как представлено в таблице 1 в данном документе. Выражение «антитело к FXI» также включает конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к FXI или его антигенсвязывающую часть, конъюгированные с лекарственным средством или токсином (т.е. цитотоксическим средством). Выражение «антитело к FXI» также включает конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие антитело к FXI или его антигенсвязывающую часть, конъюгированные с радионуклидом.

[00128] Термин «антитело к FXI», как используется в данном документе, означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается или взаимодействует с FXI или частью FXI или доменом apple 2 FXI или эпитопом в домене apple 2 FXI. Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно LCVR или V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C<sub>L1</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями,

называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела к FXI (или его антигенсвязывающая часть) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

[00129] Используемый в данном документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающий участок» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легкодоступна из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать с ней химическим путем или с использованием методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

[00130] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с делецией домена, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в термин «антигенсвязывающий фрагмент», используемый в данном документе.

[00131] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая

примыкает к каркасу или находится в каркасе с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен  $V_H$ , ассоциированный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  или  $V_L$ - $V_L$ . В качестве альтернативы антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

[00132] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (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)  $V_L$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; и (xiv)  $V_L$ - $C_L$ . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из приведенных в качестве примера конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к образованию гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерным доменом  $V_H$  или  $V_L$  (например, посредством дисульфидной(ых) связи(ей)).

[00133] Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифических антител, раскрытых в данном документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных методик, доступных в данной области техники.

[00134] В определенных случаях может быть желательным антагонизировать FXI, например, для ингибирования образования сгустков крови. Однако антитела по настоящему изобретению действуют как антагонистические антитела, которые служат ингибиторами активности FXI или FXIa и одновременно служат ингибиторами тромбоза/образования сгустка внутреннего пути. Антитела по настоящему изобретению могут функционировать

путем предупреждения взаимодействия между FXI и его расположенными выше активаторами фактора свертывания крови XII (FXII) и/или фракцией свертывания крови II (FII или тромбин). Антитела по настоящему изобретению также могут функционировать путем предупреждения взаимодействия между FXI и его целевым фактором свертывания крови IX (FIX). Антитела по настоящему изобретению также могут функционировать путем секвестрации FXI из кровотока пациента.

[00135] Термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, предназначен для включения не встречающихся в природе человеческих антител. Термин включает антитела, которые рекомбинантно продуцируются у отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека млекопитающего. Термин не предназначен для включения антител, выделенных или полученных у субъекта-человека.

[00136] Антитела по настоящему изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления, быть рекомбинантными и/или не встречающимися в природе антителами человека. Термин «рекомбинантное антитело человека», используемый в данном документе, предназначен для включения всех антител человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описанного далее ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (описанной далее ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. В определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется животное, трансгенное для последовательностей Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, будучи связанными с последовательностями  $V_H$  и  $V_L$  зародышевой линии человека, могут не существовать естественным образом в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

[00137] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с шарнирной гетерогенностью. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию около 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы было чрезвычайно трудно отделить, даже после аффинной очистки.

[00138] Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG

обусловлена без ограничения структурными различиями, ассоциированными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, которые могут быть желательными, например, при получении, для улучшения выхода требуемой формы антитела.

[00139] Термин «специфично связывается» или «специфично связывается с» или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере около  $1 \times 10^{-6}$  М или менее (например, меньший K<sub>D</sub> обозначает более плотное связывание). Способы определения того, специфично ли связываются две молекулы, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Как описано в данном документе, антитела были идентифицированы с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, которые специфично связываются с FXI. Кроме того, мультиспецифические антитела, которые связываются с белком FXI и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя различными областями FXI, тем не менее, считаются антителами, которые «специфично связываются», как используется в данном документе.

[00140] Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. «Выделенное антитело», как используется в данном документе, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой антитело естественным образом существует или естественным образом продуцируется, представляет собой «выделенное антитело» для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное антитело может по сути не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[00141] Антитела к FXI, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. После получения антитела и антигенсвязывающие

фрагменты, которые содержат одну или более мутаций, могут быть легко протестированы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или антагонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим образом, включены в настоящее изобретение.

[00142] Настоящее изобретение также включает антитела к FXI, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела к FXI, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 1 в данном документе.

[00143] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[00144] Термин «существенная идентичность» или «по сути идентичный», когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере около 95% и более предпочтительно по меньшей мере около 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого известного алгоритма идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или Gap, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или по сути сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[00145] Применительно к полипептидам термин «существенное сходство» или «по сути сходный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов

гэпов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень сходства могут быть скорректированы в сторону повышения с учетом консервативного характера замены. Средства для внесения этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенную в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспарат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами замены аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспарат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00146] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет аналогичные последовательности с использованием показателей сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с использованием параметров по умолчанию

или рекомендуемых параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивание и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

#### Характеристики антител

[00147] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают домен A2 FXI человека со значением  $K_D$  менее чем около 500 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 400 пМ, менее чем около 300 пМ, менее чем около 200 пМ, менее чем около 150 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 80 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 5 пМ, менее чем около 3 пМ или менее чем около 1 пМ.

[00148] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают активированный FXI человека (FXIa) со значением  $K_D$  менее чем около 1000 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или при 37°C. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 900 пМ, менее чем около 800 пМ, менее чем около 700 пМ, менее чем около 500 пМ, менее чем около 250 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 80 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 5 пМ, менее чем около 3 пМ или менее чем около 1 пМ.

[00149] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают FXI человека с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) более около 10 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 С или 37°C. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают FXI человека с  $t_{1/2}$  более чем около 20 минут, более чем около 50 минут, более чем около 100 минут, более чем около 120 минут, более чем около 150 минут, более чем около 300 минут, более чем около 350 минут, более чем около 400 минут, более чем около 450 минут, более чем около 500 минут, более чем около 550 минут, более чем около 600 минут, более чем около 700 минут, более чем около 800 минут, более чем около 900 минут, более чем около 1000 минут, более чем около 1100 минут или более чем около 1200 минут.

[00150] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают FXIa

человека с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) более чем около 10 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связывают FXI человека с  $t_{1/2}$  более чем около 20 минут, более чем около 50 минут, более чем около 100 минут, более чем около 120 минут, более чем около 150 минут, более чем около 300 минут, более чем около 350 минут, более чем около 400 минут, более чем около 450 минут, более чем около 500 минут, более чем около 550 минут, более чем около 600 минут, более чем около 700 минут, более чем около 800 минут, более чем около 900 минут, более чем около 1000 минут, более чем около 1100 минут или более чем около 1200 минут.

[00151] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые могут связывать или не связывать отличный от человеческого FXI. Используемое в данном документе антитело «не связывается» с конкретным антигеном (например, FXI обезьяны, мыши или крысы), если антитело при тестировании в анализе связывания антигена, таком как поверхностный плазмонный резонанс, демонстрирует  $K_D$  более чем около 1000 нМ или не демонстрирует связывания антигена в таком анализе. Другим форматом анализа, который может быть использован для определения того, связывается или не связывается антитело с конкретным антигеном в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, является ELISA.

[00152] В данной области техники общеизвестно, что активированный FXI (FXIa) активирует фактор IX путем селективного расщепления пептидных связей arg-ala и arg-val. Фактор IXa, в свою очередь, образует комплекс с фактором VIIIa (FIXa-FVIIIa) и активирует фактор X. Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые ингибируют опосредованную FXI активацию FX человека в плазме крови на по меньшей мере около 85% со значением  $IC_{50}$  менее чем около 100 пМ. Используя формат анализа, описанный в примере 4, или по сути подобный формат анализа, значение  $IC_{50}$  может быть рассчитано как концентрация антитела, необходимая для активации опосредованной FXI передачи сигнала к наблюдаемому полумаксимальному сигналу. Таким образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые опосредуют опосредованную FXI активацию FX человека в плазме крови на по меньшей мере около 85% с  $IC_{50}$  менее чем около 500 пМ, менее чем около 400 пМ, менее чем около 300 пМ, менее чем около 200 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 90 пМ, менее чем около 80 пМ, менее чем около 70 пМ, менее чем около 60 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 10 пМ или менее чем около 5 пМ, как измерено с использованием формата анализа, описанного в примере 4 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[00153] Настоящее изобретение также включает антитела к FXI, которые ингибируют опосредованную FXIa активацию FX человека в плазме крови на по меньшей мере около 25% со значением  $IC_{50}$  менее чем около 50 пМ. Используя формат анализа,

описанный в примере 4, или по сути подобный формат анализа, значение  $IC_{50}$  может быть рассчитано как концентрация антитела, необходимая для активации опосредованной FXIa передачи сигнала к наблюдаемому полумаксимальному сигналу. Таким образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые опосредуют опосредованную FXIa активацию FX человека в плазме крови на по меньшей мере около 25% с  $IC_{50}$  менее чем около 300 пМ, менее чем около 200 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 9 пМ, менее чем около 8 пМ, менее чем около 7 пМ, менее чем около 6 пМ, менее чем около 5 пМ, менее чем около 4 пМ, менее чем около 3 пМ или менее чем около 1 пМ, как измерено с использованием формата анализа, описанного в примере 4 в данном документе, или по сути аналогичного анализа.

[00154] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые предпочтительно связываются с доменом apple 2 (A2), что демонстрируется прямым связыванием с конструкциями домена A2 или конкуренцией с одним или более специфическими A2-связывающими антителами, как показано в примере 5 и примере 6 соответственно. В одном варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, не связывают каталитический домен FXI.

[00155] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые продлевают активированное частичное тромбопластиновое время (аРТТ), которое является показателем тромбогенеза внутреннего пути, при этом не оказывая измеримого влияния на протромбиновое время (РТ), которое является показателем тромбогенеза внешнего пути, в плазме крови человека. В одном варианте осуществления аРТТ измеряют в объединенной плазме крови человека, обработанной эллаговой кислотой, и РТ измеряют в объединенной плазме крови человека, обработанной тканевым фактором, с использованием анализатора гемостаза, как показано в примере 7. В данной области техники общеизвестно, что эллаговая кислота стимулирует внутренний путь тромбогенеза *in vitro*, а тканевой фактор стимулирует внешний путь тромбогенеза. В данном случае антитело к FXI удлиняет аРТТ в около два раза при концентрации менее 100 нМ, менее 90 нМ, менее 80 нМ, менее 70 нМ, менее 60 нМ, менее 50 нМ, менее 40 нМ, менее 30 нМ, менее 20 нМ, менее 10 нМ, 1 нМ-100 нМ, 1 нМ-100 нМ, 1 нМ-50 нМ, 100 пМ-50 нМ, 5 нМ-50 нМ, 5 нМ-40 нМ, 5 нМ-15 нМ, 10 нМ-20 нМ, 15 нМ-25 нМ, 20 нМ-30 нМ, 25 нМ-35 нМ, 30 нМ-40 нМ, 35 нМ-45 нМ, 40 нМ-50 нМ, 45 нМ-55 нМ, 50 нМ-60 нМ, 55 нМ-65 нМ, 60 нМ-100 нМ, 65 нМ-75 нМ, 70 нМ-80 нМ, 75 нМ-85 нМ, 80 нМ-90 нМ, 85 нМ-95 нМ, 90 нМ-100 нМ или 95 нМ-105 нМ, без удвоения РТ.

[00156] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые ингибируют продуцирование тромбина посредством внутреннего пути (внутренний тромбин) в плазме крови человека *in vitro*, практически не влияя на продуцирование тромбина посредством внешнего пути (внешний тромбин). В одном варианте осуществления специфическое в отношении пути продуцирование тромбина определяют *in vitro* с помощью анализа

образования тромбина с использованием калиброванной автоматизированной тромбограммы, как показано в примере 7. В данном случае создают профиль образования тромбина и определяют пиковую концентрацию тромбина в плазме крови, обработанной эллаговой кислотой, и в плазме крови, обработанной тканевым фактором, с антителом к FXI и без него. Таким образом, в одном варианте осуществления антитела к FXI ингибируют продуцирование собственного тромбина в концентрации 0,1 нМ-100 нМ, 1 нМ-100 нМ, 5 нМ-500 нМ, 5 нМ-100 нМ, 10 нМ-100 нМ, 10 нМ-50 нМ, 5 нМ-15 нМ, 10 нМ-20 нМ, 25 нМ-35 нМ, 30 нМ-40 нМ, 35 нМ-45 нМ, 40 нМ-50 нМ, 45 нМ-55 нМ, 50 нМ-60 нМ, 55 нМ-65 нМ, 60 нМ-65 нМ,  $\geq 20$  нМ,  $\geq 25$  нМ,  $\geq 30$  нМ,  $\geq 35$  нМ,  $\geq 40$  нМ,  $\geq 45$  нМ,  $\geq 50$  нМ,  $\geq 55$  нМ,  $\geq 5$  нМ,  $\geq 10$  нМ или  $\geq 15$  нМ. В данном случае антитела к FXI не оказывают влияния на продуцирование внешнего тромбина с любой концентрацией до 500 нМ.

[00157] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые увеличивают в по меньшей мере два раза активированное частичное тромбопластиновое время (аРТТ) у приматов *in vivo* без измеримого влияния на протромбиновое время (РТ). В данном случае примату вводят антитело к FXI, плазму крови получают от примата, плазму крови приводят в контакт с эллаговой кислотой или тканевым фактором, а затем определяют аРТТ или РТ соответственно, в анализе, как показано в примере 8. В одном варианте осуществления примат представляет собой человека. В одном варианте осуществления примат представляет собой обезьяну.

[00158] В одном варианте осуществления антитело к FXI вводят парентерально в дозе 0,01 мг/кг-20 мг/кг, 0,1 мг/кг-10 мг/кг, 1 мг/кг-10 мг/кг, около 0,1 мг/кг, около 0,2 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 0,4 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 0,6 мг/кг, около 0,7 мг/кг, около 0,8 мг/кг, около 0,9 мг/кг, около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 7 мг/кг, около 8 мг/кг, около 9 мг/кг, около 10 мг/кг, около 11 мг/кг, около 12 мг/кг, около 13 мг/кг, около 14 мг/кг или около 15 мг/кг.

[00159] В одном варианте осуществления аРТТ продлевают при лечении антителом к FXI по сравнению с отсутствием лечения антителом к FXI в по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 2,5 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 3,5 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 4,5 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 5,5 раза или по меньшей мере 6 раз.

[00160] В одном варианте осуществления опосредованный антителом к FXI эффект пролонгации аРТТ сохраняется у субъекта после получения дозы антитела к FXI в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев или по меньшей мере 6 месяцев.

[00161] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые ингибируют пиковую активность тромбина внутреннего пути у приматов *in vivo* без измеримого влияния на пиковую активность тромбина внешнего пути. В данном случае примату вводят антитело к FXI, плазму крови получают от примата, плазму крови приводят в контакт с эллаговой

кислотой или тканевым фактором, а затем определяют образование собственного тромбина или внешнего тромбина соответственно, в анализе образования тромбина, как показано в примере 8. В одном варианте осуществления примат представляет собой человека. В одном варианте осуществления примат представляет собой обезьяну.

[00162] В одном варианте осуществления антитело к FXI вводят парентерально в дозе 0,01 мг/кг-20 мг/кг, 0,1 мг/кг-10 мг/кг, 1 мг/кг-10 мг/кг, около 0,1 мг/кг, около 0,2 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 0,4 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 0,6 мг/кг, около 0,7 мг/кг, около 0,8 мг/кг, около 0,9 мг/кг, около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 7 мг/кг, около 8 мг/кг, около 9 мг/кг, около 10 мг/кг, около 11 мг/кг, около 12 мг/кг, около 13 мг/кг, около 14 мг/кг или около 15 мг/кг.

[00163] В одном варианте осуществления пиковая внутренняя активность тромбина (т.е. тромбина, образуемого с помощью эллаговой кислоты) при лечении антителом к FXI по сравнению с отсутствием лечения антителом к FXI ингибируется на 1%-100%, 5%-95%, 10%-90%, 20%-80%, 1%-10%, 5%-20%, 10%-30%, 15%-40%, 20%-50%, 25%-60%, 5%-15%, 10%-20%, 15%-25%, 20%-30%, 25%-35%, 30%-40%, 35%-45%, 40%-50%, 45%-55%, 50%-60%, 55%-65%, 60%-70%, 65%-75%, 70%-80%, 75%-85%, 80%-90%, 85%-95%, 90%-100%, 95%-105% или  $\geq 100\%$ .

[00164] В одном варианте осуществления опосредованное антителом к FXI ингибирование пиковой внутренней активности тромбина сохраняется у субъекта после получения дозы антитела к FXI в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев или по меньшей мере 6 месяцев.

[00165] Характеристика связывания антитела по настоящему изобретению (например, любая из характеристик связывания, упомянутых в данном документе выше), при раскрытии в терминах «измеренный с помощью поверхностного плазмонного резонанса» означает, что соответствующая характеристика связывания, относящаяся к взаимодействию между антителом и антигеном, измеряется с использованием инструмента поверхностного плазмонного резонанса (например, прибора Biacore®, GE Healthcare) с использованием стандартных условий анализа Biacore, как показано в примере 3 в данном документе, или по сути аналогичного формата анализа. В определенных вариантах осуществления параметры связывания измеряют при 25°C, тогда как в других вариантах осуществления параметры связывания измеряют при 37°C.

[00166] Настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связывают FXI, содержащие HCVR и/или LCVR, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, представленных в таблице 1.

[00167] Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или более из вышеупомянутых биологических характеристик или любой их комбинацией. Приведенный

выше перечень биологических характеристик антител по настоящему изобретению не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в данной области техники из обзора настоящего изобретения, включая рабочие примеры в настоящем документе.

#### Картирование эпитопов и связанные технологии

[00168] Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может состоять из одной смежной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка FXI. В качестве альтернативы эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) FXI. В некоторых вариантах осуществления эпитоп расположен на поверхности FXI или вблизи нее, например, в домене, который взаимодействует с любым из его лигандов, например, FXIIa, тромбином и FIX. В других вариантах осуществления эпитоп расположен на поверхности FXI или вблизи нее, которая не взаимодействует с лигандом FXI, например, в месте на поверхности FXI, где антитело при связывании с таким эпитопом не препятствует взаимодействию между FXI и его лигандом.

[00169] Различные методики, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для определения того, «взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами» в полипептиде или белке. Примеры методик включают, например, стандартный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), аланин-сканирующий мутационный анализ, анализ пептидных блотов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, могут быть использованы такие способы, как иссечение эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является обмен водорода/дейтерия, обнаруженный с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ обмена водорода/дейтерия включает мечение дейтерием белка, представляющего интерес, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить водородно-дейтериевый обмен во всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00170] Настоящее изобретение включает антитела к FXI, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в таблице 1 в данном документе). Аналогичным

образом, настоящее изобретение также включает антитела к FXI, которые конкурируют за связывание с FXI с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в таблице 1 в данном документе).

[00171] Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к FXI, или конкурирует за связывание с ним, используя стандартные способы, известные в данной области техники и приведенные в качестве примера в данном документе. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к FXI по настоящему изобретению, эталонному антителу дают возможность связываться с белком FXI. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой FXI. Если тестируемое антитело способно связываться с FXI после насыщающего связывания с эталонным антителом к FXI, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело к FXI. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой FXI после насыщающего связывания с эталонным антителом к FXI, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к FXI по настоящему изобретению. Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, анализы мутации и связывания пептида), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или если стерическое блокирование (или другое явление) отвечает за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода могут быть проведены с использованием ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратное превышение одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по сути все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела. Считается, что два антитела имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

[00172] Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным антителом к FXI, описанную выше методологию связывания выполняют в двух ориентациях. В первой ориентации эталонному антителу дают возможность связываться с белком FXI в условиях насыщения с последующей

оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой FXI. Во второй ориентации тестируемому антителу дают возможность связываться с молекулой FXI в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой FXI. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой FXI, то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с FXI (см., например, формат анализа, описанный в примерах в данном документе, в котором белок FXI захватывают на наконечники датчиков, а наконечники датчиков с покрытием FXI обрабатывают эталонным антителом [mAb-1] и тестируемым антителом к FXI [mAb-2] последовательно и в обоих порядках связывания). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может не обязательно связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

#### Получение антител человека

[00173] Антитела к FXI по настоящему изобретению могут быть полностью человеческими, но не встречающимися в природе антителами. Способы получения моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела, известны в данной области техники. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфично связываются с FXI человека.

[00174] Используя технологию VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к аллергену, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепей человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[00175] Как правило, мыши VELOCIMMUNE® стимулируют антигеном, представляющим интерес, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют из мышей, экспрессирующих антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с клеточной линией миеломы для получения иммортальных клеточных линий гибридомы, и такие клеточные линии гибридомы подвергают скринингу и отбирают для идентификации клеточных линий гибридомы, которые продуцируют антитела, специфичные к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с требуемыми изотипическими константными

областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть продуцирован в клетке, такой как клетка СНО. В качестве альтернативы ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[00176] Как описано в экспериментальном разделе ниже, высокоаффинные химерные антитела, которые выделены с переменной областью человека и константной областью мыши, характеризуют и отбирают по требуемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Затем константные области мыши заменяют требуемой константной областью человека для получения полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания с антигеном и специфичности к мишени находятся в переменной области.

[00177] В определенных вариантах осуществления может быть желательным тестирование антител к FXI человека на мышах или крысах, которые были сконструированы для экспрессии рецептора FXI человека. Эти мыши или крысы могут быть полезны в условиях, когда антитела к FXI могут связываться только с FXI человека, но не будут перекрестно реагировать с FXI мыши или крысы. Любой способ, известный специалистам в данной области техники, может быть использован для получения таких гуманизированных по FXI мышей и крыс.

[00178] Как правило, антитела по настоящему изобретению обладают очень высокой аффинностью, обычно обладая  $K_D$  от около  $10^{-12}$  до около  $10^{-9}$  М, при измерении связывания с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе или в фазе раствора.

#### Биоэквиваленты

[00179] Антитела к FXI и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать FXI человека. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по сути эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело к FXI, по настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело к FXI или фрагмент антитела, который по сути биоэквивалентен антителу к FXI или фрагменту антитела по настоящему изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждаются выше.

[00180] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых

не демонстрируют существенной разницы при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, либо однократной, либо многократной дозе. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются незначимыми с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

[00181] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и активности отсутствуют.

[00182] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может быть переключен один или более раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска нежелательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

[00183] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия для состояния или условий применения, в той степени, в которой такие механизмы известны.

[00184] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и *in vitro*. Показатели биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который был коррелирован с данными биодоступности человека *in vivo* и является обоснованно предсказуемым; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется в зависимости от времени; и (d) в хорошо контролируемое клиническое исследование, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

[00185] Биоэквивалентные варианты антител к FXI по настоящему изобретению могут быть сконструированы, например, путем проведения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не требуемых для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся существенными для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предупреждения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты

антител к FXI, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

#### Селективность видов и перекрестная реактивность видов

[00186] Настоящее изобретение, в соответствии с определенными вариантами осуществления, относится к антителам к FXI, которые связываются с FXI человека, но не связываются с FXI других видов. Настоящее изобретение также включает антитела к FXI, которые связываются с FXI человека и с FXI одного или более отличных от человека видов. Например, антитела к FXI по настоящему изобретению могут связываться с FXI человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или более из FXI мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака резус или шимпанзе. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения представлены антитела к FXI, которые специфично связывают FXI человека, но не связывают или связывают только слабо FXI мыши или крысы.

#### Мультиспецифические антитела

[00187] Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут быть специфичными для различных эпитопов одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного полипептида-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела к FXI по настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

[00188] Настоящее изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает FXI человека, а другое плечо иммуноглобулина специфично ко второму антигену. FXI-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в таблице 1 в данном документе.

[00189] Иллюстративный формат биспецифического антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, включает применение первого домена C<sub>H3</sub> иммуноглобулина (Ig) и второго домена C<sub>H3</sub> Ig, где первый и второй домены C<sub>H3</sub> Ig отличаются друг от друга на по меньшей мере одну аминокислоту, и где по меньшей мере одно аминокислотное различие уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим аминокислотного

различия. В одном варианте осуществления первый домен Ig C<sub>H3</sub> связывает белок А, а второй домен Ig C<sub>H3</sub> содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание белка А, такую как модификация Н95R (по нумерации экзонов согласно IMGT; Н435R по нумерации согласно EU). Второй C<sub>H3</sub> может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены во втором C<sub>H3</sub>, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (согласно IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Вариации формата биспецифического антитела, описанные выше, рассматриваются в рамках настоящего изобретения.

[00190] Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, слияния IgG-scFv, двойной переменный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами-впадинах и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, биспецифические форматы Fab (DAF)-IgG и Mab<sup>2</sup> двойного действия (см., например, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11 и ссылки, цитируемые в них, для обзора вышеуказанных форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, где неприродные аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью используются для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самоорганизуются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

#### Терапевтические составы и введение

[00191] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела к FXI или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, толерантность и т.п. Множество подходящих составов можно найти в формуляре, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липиды (катионные или анионные), содержащие везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло в воде и вода в масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm

Sci Technol 52:238-311.

[00192] Доза антитела, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу обычно рассчитывают в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. У взрослого пациента это может представлять собой предпочтительно внутривенное введение антитела по настоящему изобретению обычно в однократной дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения антител к FXI могут быть определены эмпирически; например, прогресс пациента может контролироваться путем периодической оценки, и доза корректируется соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных способов в данной области техники (например, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[00193] Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения интравитреальный, интраокулярный, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композиция может быть введена любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и может быть введена вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

[00194] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, устройство для доставки в виде шприц-ручки легко может быть использовано для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое устройство для доставки в виде шприц-ручки может быть многоразовым или одноразовым. В устройстве для доставки в виде многоразового шприц-ручки обычно используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции внутри картриджа и опорожнения картриджа пустой картридж может быть легко утилизирован и заменен новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. Затем устройство доставки в виде шприц-ручки может быть использовано повторно. В одноразовом устройстве доставки в виде шприц-ручки сменный картридж отсутствует. Скорее, одноразовое устройство для доставки в виде шприц-ручки поставляется предварительно

заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар освобождается от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

[00195] Многочисленные многоразовые устройства доставки с помощью шприц-ручки и автоинъектора могут применяться для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), DISETRONIC™ pen (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), HUMALOG MIX 75/25™ pen, HUMALOG™ pen, HUMALIN 70/30™ pen (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), BD™ Pen (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия). Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприц-ручки, имеющих применение для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузенд-Оукс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эбботт Парк, Иллинойс), и это лишь некоторые из них.

[00196] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может быть использован насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления система контролируемого высвобождения может быть размещена вблизи мишени композиции, что требует только части системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

[00197] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, интравитреальных, внутриглазных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-

активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которое можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

[00198] Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственные формы в единичной дозе, подходящей для дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося указанного антитела, как правило, составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы указанное антитело содержалось от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические варианты применения антител

[00199] Настоящее изобретение включает способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антитело к FXI (например, антитело к FXI, содержащее любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в таблице 1 в данном документе). Терапевтическая композиция может содержать любое одно или более антител к FXI или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[00200] Антитела по настоящему изобретению применимы, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированных или опосредованных экспрессией или активностью FXI. Антагонистические антитела к FXI по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или предупреждения тромбоза, особенно тромбоза внутреннего пути, при минимизации отрицательного влияния на гемостаз и образование сгустков посредством внешнего пути.

[00201] Настоящее изобретение включает способы лечения или предупреждения тромбоза путем введения пациенту, нуждающемуся в таком лечении, антитела к FXI или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в другом месте в данном документе.

[00202] В одном варианте осуществления антитела к FXI по настоящему изобретению могут обеспечивать способ лечения или предупреждения тромбоза, ассоциированного с любым одним или более из фактора V Лейдена, мутации гена протромбина, дефицитов природных белков, которые предупреждают свертывание (таких как антитромбин, белок C и белок S), повышенных уровней гомоцистеина, повышенных уровней фибриногена или дисфункционального фибриногена (дисфибриногенемия), повышенных уровней фактора VIII, фактора IX и/или XI, аномальной фибринолитической системы, включая гипоплазминогенемия, дисплазминогенемия и повышение уровней

ингибитора активатора плазминогена (РАI-1), фибрилляции предсердий, рака, побочных эффектов некоторых лекарственных средств, применяемых для лечения рака, таких как тамоксифен, бевацизумаб, талидомид и леналидомид, недавнюю травму или операцию, установку центрального венозного катетера, ожирение, беременность, дополнительное применение эстрогенов, включая оральные контрацептивы (противозачаточные таблетки), заместительную гормональную терапию, длительный постельный режим или неподвижность, сердечный приступ, застойную сердечную недостаточность, инсульт и другие заболевания, которые приводят к снижению активности, гепарин-индуцированной тромбоцитопении (снижение количества тромбоцитов в крови вследствие применения гепарина или низкомолекулярных препаратов гепарина), длительное путешествие в самолете, синдром антифосфолипидных антител, тромбоз глубоких вен или легочной эмболии, миелопролиферативных нарушений, таких как истинная полицитемия или эссенциальный тромбоцитоз, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, синдром воспалительного кишечника, ВИЧ/СПИД, нефротический синдром, инфекция COVID-19 или эффекты иммунизации спайк-белком и т.п.

[00203] В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, антитело к FXI можно вводить в качестве монотерапии (т.е. в качестве единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами.

#### Комбинированные виды терапии и составы

[00204] Настоящее изобретение включает композиции и терапевтические составы, содержащие любое из антител к FXI, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций субъектам, нуждающимся в этом.

[00205] Антитела к FXI по настоящему изобретению могут быть совместно составлены с одним или более лекарственными средствами, применяемыми для лечения тромбоза фактора V Лейдена, мутации гена протромбина, дефицитов природных белков, которые предупреждают свертывание (таких как антитромбин, белок C и белок S), повышенных уровней гомоцистеина, повышенных уровней фибриногена или дисфункционального фибриногена (дисфибриногенемия), повышенных уровней фактора VIII, фактора IX и/или XI, аномальной фибринолитической системы, включая гипоплазминогению, дисплазминогению и повышение уровней ингибитора активатора плазминогена (РАI-1), фибрилляции предсердий, рака, побочных эффектов некоторых лекарственных средств, применяемых для лечения рака, таких как тамоксифен, бевацизумаб, талидомид и леналидомид, недавнюю травму или операцию, установку центрального венозного катетера, ожирение, беременность, дополнительное применение эстрогенов, включая оральные контрацептивы (противозачаточные таблетки), заместительную гормональную терапию, длительный постельный режим или неподвижность, сердечный приступ, застойную сердечную недостаточность, инсульт и другие заболевания, которые приводят к снижению активности, гепарин-индуцированной

тромбоцитопении (снижение количества тромбоцитов в крови вследствие применения гепарина или низкомолекулярных препаратов гепарина), длительное путешествие в самолете, синдром антифосфолипидных антител, тромбоз глубоких вен или легочной эмболии, миелопролиферативных нарушений, таких как истинная полицитемия или эссенциальный тромбоцитоз, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, синдром воспалительного кишечника, ВИЧ/СПИД, нефротический синдром, инфекция COVID-19 или эффекты иммунизации спайк-белком и т.п.

[00206] Антитела к FXI по настоящему изобретению также могут быть введены и/или составлены в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, антиоксидантами, ингибиторами COX и/или NSAID. Антитела к FXI также можно применять в сочетании с другими видами терапии, включая терапию стволовыми клетками, фильтрационную хирургию глаукомы, лазерную хирургию или генную терапию.

[00207] Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы), например, любое из средств, представленных выше, или его производные, можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения антитела к FXI по настоящему изобретению; (для целей настоящего изобретения такие схемы введения считаются введением антитела к FXI «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к FXI по настоящему изобретению совместно составлено с одним или более дополнительным(ыми) терапевтически активным(и) компонентом(ами), описанным(и) в другом месте в данном документе.

#### Режимы введения

[00208] В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела к FXI (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к FXI и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антитела к FXI по настоящему изобретению. Используемый в данном документе термин «последовательное введение» означает, что каждую дозу антитела к FXI вводят субъекту в разный момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антитела к FXI с последующей одной или более вторичными дозами антитела к FXI и, необязательно, с последующей одной или более третичными дозами антитела к FXI.

[00209] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антитела к FXI по настоящему изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемую «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы»

представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антитела к FXI, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В определенных вариантах осуществления, однако, количество антитела к FXI, содержащегося в начальных, вторичных и/или третичных дозах, отличается друг от друга (например, скорректировано выше или ниже, в зависимости от обстоятельств) в течение курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения в виде «нагрузочных доз» с дальнейшими последующими дозами, которые вводят реже (например, «поддерживающие дозы»).

[00210] В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят от 1 до 26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», используемая в данном документе, означает в последовательности нескольких введений, дозу антитела к FXI, которую вводят пациенту до введения самой следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00211] Способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела к FXI. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз. Режим введения можно проводить в течение неопределенного времени в течение жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение больше не будет терапевтически необходимым или предпочтительным.

[00212] В вариантах осуществления, включающих несколько вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели или 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих несколько третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может изменяться в течение режима лечения. Частота введения также может быть скорректирована в ходе лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

[00213] Настоящее изобретение включает режимы введения, в которых пациенту вводят от 2 до 6 нагрузочных доз с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз

каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца и т.д.), с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз на менее частой основе. Например, в соответствии с этим аспектом изобретения, если нагрузочные дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы можно вводить пациенту один раз каждые шесть недель, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца и т.д.

#### Диагностические варианты применения антител

[00214] Антитела к FXI по настоящему изобретению также могут быть использованы для обнаружения и/или измерения FXI или экспрессирующих FXI клеток в образце, например, в диагностических целях. Например, антитело к FXI или его фрагмент можно применять для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, заниженной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) FXI. Иллюстративные диагностические анализы для FXI могут включать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к FXI по настоящему изобретению, причем антитело к FXI мечено детектируемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы немеченое антитело к FXI может быть использовано в диагностических вариантах применения в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе мечено обнаружимым образом. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{125}\text{I}$ ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые могут быть использованы для обнаружения или измерения FXI в образце, включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[00215] Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах FXI в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит обнаруживаемые количества белка FXI или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни FXI в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или патологическим состоянием, ассоциированными с аномальными уровнями или активностью FXI), будут измеряться для первоначального установления исходного или стандартного уровня FXI. Затем этот исходный уровень FXI можно сравнить с уровнями FXI, измеренными в образцах, полученных от лиц, у которых имеется подозрение на наличие заболевания или состояния, связанных с FXI.

#### ПРИМЕРЫ

[00216] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как изготавливать и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы рассматривают как их

изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C, а давление равно или близко к атмосферному.

**Пример 1: Получение человеческих антител к домену A2 FXI**

[00217] Человеческие антитела к домену A2 FXI получали у мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой и легкой цепи каппа иммуноглобулина человека. В одном варианте осуществления человеческие антитела получали у мыши VELOCIMMUNE®. В одном варианте осуществления мышью VelocImmune® (VI) иммунизировали FXI человека. Иммуный ответ антитела контролировали с помощью специфического в отношении FXI иммуноанализа. Например, сыворотки крови анализировали в отношении специфических титров антител к очищенному полноразмерному FXI. Клоны, продуцирующие антитела, выделяли с использованием как технологии сортировки В-клеток (BST), так и гибридных способов. Например, когда был достигнут требуемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования клеточных линий гибридомы. Клеточные линии гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, продуцирующих специфические в отношении FXI антитела.

[00218] Антитела к FXI также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток мыши без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США 7582298, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Используя этот способ, получали несколько полностью человеческих антител к FXI (т.е. антител, обладающих вариabельными доменами человека и константными доменами человека).

[00219] Биологические свойства иллюстративного антитела, полученного в соответствии со способами настоящего примера, контролей и препаратов сравнения, подробно описаны в разделе «Примеры», изложенном ниже.

**Пример 2: Последовательности вариabельной области тяжелой и легкой цепи**

[00220] В столбцах 2 и 4 таблицы 1 указаны идентификаторы аминокислотных последовательностей вариabельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR иллюстративных антител к FXI по настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот для иллюстративных антител к FXI по настоящему изобретению представлены в таблице 1, столбцы 3 и 5.

**Таблица 1: Идентификаторы последовательностей антител к FXI**

Часть антитела	REGN9933 Аминокислота	REGN9933 Нуклеиновая	H4H29801P2 Аминокислота	H4H29801P2 Нуклеиновая
----------------	--------------------------	-------------------------	----------------------------	---------------------------

	SEQ ID NO	кислота SEQ ID NO	SEQ ID NO	кислота SEQ ID NO
Полноразмерная тяжелая цепь (HC)	1	2	29	30
Вариабельная область тяжелой цепи (HCVR)	3	4	31	32
HCDR1	5	6	33	34
HCDR2	7	8	35	36
HCDR3	9	10	37	38
Полноразмерная легкая цепь	11	12	11	12
Вариабельная область легкой цепи (LCVR)	13	14	13	14
LCDR1	15	16	15	16
LCDR2	17	18	17	18
LCDR3	19	20	19	20

[00221] SEQ ID NO: 17 содержит следующую однобуквенную аминокислотную последовательность: AAS.

[00222] SEQ ID NO: 18 содержит следующую нуклеотидную последовательность: GCTGCATCC.

[00223] Иллюстративное полноразмерное антитело к FXI содержит полностью человеческие последовательности тяжелой цепи Fc-гамма 4 (т.е. Fc IgG4) и полностью человеческие последовательности легкой цепи. Однако, как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши может быть превращено в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (включая CDR), которые указаны числовыми идентификаторами, показанными в таблице 1, останутся неизменными, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по сути сходными независимо от природы домена Fc.

#### **Контрольная конструкция, используемая в следующих примерах**

[00224] Контрольную конструкцию (антитело к домену A2 FXI), помеченную как COMP3448, включали в эксперименты, раскрытые в данном документе, для сравнительных целей: «моноклональное антитело, специфическое к fXI», содержащее последовательности VH/VL антитела «14E11» в соответствии с патентом США № 8388959, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Пример 3: Кинетика связывания на основе Вiascore моноклональных антител к FXI, связывающихся с различными реагентами FXI, измеренная при 25°C и 37°C

[00225] Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) для различных реагентов FXI, связывающихся с очищенными моноклональными антителами к FXI, определяли с использованием биосенсора Вiascore 8К на основе поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени. Все исследования связывания проводили в 10 мМ буфере HEPES, 300 мМ NaCl и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-P) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Вiascore CM5 сначала дериватизировали путем аминокислотного с мышинным моноклональным специфическим антителом к Fc человека (Regeneron, Tarrytown) для захвата моноклональных антител к FXI. Исследования связывания проводили с FXI человека (зимоген; белок фактора XI, плазма крови человека, Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, № в кат. HFXI 1111) и FXIa (активированный; белок фактора XIa, плазма крови человека, Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, № в кат. HFXIa 1111a). Различные концентрации hFXI и hFXIa (25 нМ - 0,39 нМ; 4-кратное серийное разведение) (сначала готовили в подвижном буфере HBS-P и вводили на поверхность моноклонального антитела к Fc человека, захваченного FXI, в течение 3 минут со скоростью потока 30 мкл/минута, в то время как диссоциацию реагента FXI, связанного с моноклональным антителом, контролировали в течение 10 минут в подвижном буфере HBS-P. Скорость ассоциации ( $k_a$ ) и скорость диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем подгонки сенсограмм связывания в реальном времени к модели связывания 1:1 с ограничением переноса массы с использованием программного обеспечения для подгонки кривой Scrubber 2.0с. Константу равновесия диссоциации связывания ( $K_D$ ) и диссоциативный период полужизни ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали по кинетическим скоростям как:

$$\text{Ур. 1: } K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} \text{ (мин.)} = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

[00226] Параметры кинетики связывания для связывания hFXI или hFXIa с рассматриваемым моноклональным антителом к FXI по настоящему изобретению и изотипическим контролем при 25°C и 37°C показаны в таблице 2 и таблице 3.

[00227] При 25°C моноклональные антитела к FXI связывались с hFXI со значениями  $K_D$  в диапазоне от 35,1 пМ до 7,53 пМ, как показано в таблице 2. При 37°C моноклональные антитела к hFXI связывались с hFXI со значениями  $K_D$  в диапазоне от 13,7 пМ до 48,3 пМ, как показано в таблице 2.

[00228] При 25°C моноклональные антитела к FXI связывались с hFXIa со значениями  $K_D$  в диапазоне от 257 до 269 пМ, как показано в таблице 3. При 37°C моноклональные антитела к FXI связывались с hFXIa со значениями  $K_D$  в диапазоне от 763 до 893 пМ, как показано в таблице 3.

**Таблица 2:** Параметры кинетики связывания hFXI с моноклональными антителами к FXI и изотипическим контролем.

Мишень/ температура (°C)	Захваченно е mAb	Уровень захвата mAb (RU)	25 нМ связан ного Ag (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
hFXI (25°C)	REGN9933	347,8 ± 1,2	195	3,26E+05	1,15E-05	3,51E-11	1008
	H4H29801P2	373,5 ± 0,7	188,1	2,57E+05	1,94E-05	7,53E-11	596,4
	Изотипическ ий контроль [REGN1945]	413,0 ± 0,6	1,3	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.	Связ. отсутс тв.
hFXI (37°C)	REGN9933	445,4 ± 1,5	266,8	7,29E+05	≤1,00E- 05	1,37E-11	≥ 1155
	H4H29801P2	470,7 ± 0,9	247	4,90E+05	2,37E-05	4,83E-11	488
	Изотипическ ий контроль [REGN1945]	614,8 ± 0,8	3,2	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.	Связ. отсутс тв.

Связ. отсутств.: связывание отсутствует; IC: неокончательный вывод

**Таблица 3:** Параметры кинетики связывания hFXIa с моноклональными антителами к FXI и изотипическим контролем.

Мише нь/ темпер атура (°C)	Захваченно е mAb	Уровень захвата mAb (RU)	25 нМ связан ного Ag (RU)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	KD (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
hFXIa (25°C)	REGN9933	346,7 ± 1,6	247,1	5,91E+ 05	1,52E-04	2,57E-10	76
	H4H29801P2	372,0 ± 1,5	249,3	4,40E+ 05	1,18E-04	2,69E-10	97,7
	Изотипическ ий контроль [REGN1945]	70,5 ± 33,5	-1,4	Связ. отсутст в.	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.
hFXIa	REGN9933	425,1 ±	227,3	6,38E+	4,87E-04	7,63E-10	23,7

(37°C)		13,9		05			
	H4H29801P2	450,4 ± 13,1	211,1	6,03E+ 05	5,39E-04	8,93E-10	21,4
	Изотипическ ий контроль [REGN1945]	612,7 ± 1,8	0,3	Связ. отсутст в.	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.

Связ. отсутств.: связывание отсутствует; IC: неокончательный вывод

Пример 4: Биоанализ активированного частичного тромбопластинового времени

Порядок проведения эксперимента:

[00229] Набор фактора XIa BIOPHEN (HYPHEN BioMed, Neuville-sur-Oise, FR, № в кат. 220412) использовали для оценки способности антитела к FXI по настоящему изобретению ингибировать активность зимогенного фактора FXI (FXI) или предварительно активированного FXIa, приводящего к образованию активного фактора Ха (FXa). Ингибирование антителами по настоящему изобретению определяли путем измерения уменьшения количества хромогенного субстрата, преобразованного с помощью FXa (компонент R3 набора BIOPHEN). Все реагенты в наборе BIOPHEN использовались в анализе, за исключением реагента 1B (фактор IX человека) и калибратора FXIa (Cal).

[00230] Для проверки дозозависимой активности FXI или FXIa, плазму крови здорового человека первоначально разбавляли до 0,65% плазмы крови в предоставленном буфере Tris-BSA (используемом в качестве буфера для разведения для анализа), а затем серийно разбавляли до 0,021% плазмы крови вместе с контролем без плазмы крови. Плазму крови здорового человека также разбавляли до 0,13% или 0,15% плазмы крови. Антитела (антитела к FXI, контроли и препараты сравнения) серийно разбавляли от начальной концентрации 500 нМ или 300 нМ до концентрации 5,1 пМ только буферным образцом. Для ингибирования зимогена FXI антитело к FXI предварительно инкубировали в течение 30 минут при 25°C с разбавленной плазмой крови с последующей еще одной 30-минутной инкубацией с 0,32 мкМ эллаговой кислоты aPTT-XL при 25°C. Для ингибирования активного FXIa разбавленную плазму крови предварительно активировали 0,3 2 мкМ эллаговой кислотой aPTT-XL в течение 30 минут при 25°C с последующей инкубацией с антителом к FXI в течение 30 минут при 25°C.

[00231] После инкубации плазмы крови с эллаговой кислотой и антителом добавляли реагент 1A (FX человека, FVIII:C, ингибитор полимеризации фибрина) и инкубировали в течение 5 минут при 37°C. Затем добавляли реагент 2 (тромбин, фосфолипиды и кальций) и инкубировали в течение 5 минут при 37°C. Наконец, добавляли реагент 3 (субстрат SXa-11 FXa) и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Поглощение измеряли на планшет-ридере FLEXSTATION 3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) при длине волны 405 нм. Результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистика) с помощью программного обеспечения PRISM®6 (GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния) с получением значений EC<sub>50</sub> и

IC<sub>50</sub>. Процент ингибирования рассчитывали на основании уравнения 2 ниже:

$$\text{Ур. 2: } \% \text{ ингибирования} = 100 \times$$

$$\frac{\text{Поглощение}_{\text{разбавленная плазма крови}} - \text{Поглощение}_{\text{ингибирование}}}{\text{Поглощение}_{\text{разбавленная плазма крови}} - \text{Поглощение}_{\text{без контроля плазмы крови}}}$$

[00232] В этом уравнении «Поглощение<sub>разбавленная плазма крови</sub>» относится к измерению поглощения при 405 нм разбавленной плазмы крови (либо 0,13%, либо 0,15% плазмы крови), которую активировали 0,32 мкМ аРТТ-XL эллаговой кислоты для расщепления FXI на FXIa без какого-либо добавления антитела. «Поглощение<sub>ингибирование</sub>» относится к измерению минимального поглощения при длине волны 405 нм на основании ответа дозы конкретного антитела с разбавленной плазмой крови, активированной 0,32 мкМ эллаговой кислоты. «Поглощение<sub>без контроля плазмы крови</sub>» относится к измерению поглощения при 405 нм только буфера Tris-BSA в отсутствие какой-либо плазмы крови.

**Таблица 4:** Антитело к FXI/FXIa ингибирует активацию FXI к FXIa или предварительно активированную активность FXIa в анализе на эллаговую кислоту аРТТ-XL.

Антитело	0,13% плазмы крови				0,15% плазмы крови			
	FXI		FXIa		FXI		FXIa	
	% ингибирования	IC50 [M]	% ингибирования	IC50 [M]	% ингибирования	IC50 [M]	% ингибирования	IC50 [M]
REGN993 3	85	3,9E-11	25	>1,0E-08	не тестировалось	не тестировалось	не тестировалось	не тестировалось
H4H2980 1P	87	2,2E-10	22	6,8E-10	не тестировалось	не тестировалось	не тестировалось	не тестировалось
mAb сравнения [REGN3448]	86	2,7E-11	35	>1,0E-08	108	2,9E-11	38	>5,0E-08 (38%)
mAb изотипического контроля	58	>1,0E-07	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует	102	1,2E-07	ингибирование отсутствует	ингибирование отсутствует

[ REGN194 5]				твует				
--------------------	--	--	--	-------	--	--	--	--

[00233] Как показано в таблице 4, антитело к FXI/FXIa демонстрировало ингибирование FXI в разбавленной нормальной плазме крови со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 39 до 220 пМ (в одном примере 39 пМ) с максимальным ингибированием в диапазоне от 85 до 87% (в одном примере 85%). Антитело к FXI/FXIa по настоящему изобретению также ингибировало FXIa в разбавленной плазме крови со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 680 пМ до более 10 нМ (в одном примере 10 нМ) с максимальным ингибированием в диапазоне от 22% до 25%, в одном примере 25%). mAb сравнения демонстрировали ингибирование FXI со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 27 пМ до 29 пМ с максимальным ингибированием в диапазоне от 86% до 106%. mAb сравнения также демонстрировали ингибирование FXIa со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от > 10 нМ до > 5 нМ с максимальным ингибированием в диапазоне от 35% до 38%. mAb изотипического контроля не демонстрировало ингибирования FXIa, но демонстрировало ингибирование FXI при высокой концентрации антитела со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне > 100 нМ - 120 нМ с максимальным ингибированием в диапазоне 58-102% ингибирования.

#### Пример 5: Специфичность связывания антитела к FXI с субъединицами FXI

[00234] Специфичность связывания различных моноклональных антител к FXI с различными усеченными доменами apple FXI человека определяли с помощью анализа безмаркерной биослойной интерферометрии в реальном времени на биосенсоре ОСТЕТНТХ (Pall ForteBio Corp., Порт Вашингтон, Нью-Йорк). Эксперимент проводили при 25°C в 10 мМ буфере HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества TWEEN-20, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), pH 7,4 (HBS-EBT) с встряхиванием планшета со скоростью 1000 об./мин. Связывание моноклональных антител к FXI с их соответствующими эпитопами на рекомбинантных белках FXI человека тестировали с использованием FXI человека, экспрессируемого с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hFXI-mmh; SEQ ID NO: 22), домена PKA1 FXI человека, экспрессируемого с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hFXI-PKA1-mmh; SEQ ID NO: 23), домена PKA2 FXI человека, экспрессируемого с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hFXI-PKA2-mmh; SEQ ID NO: 24), домена PKA3 FXI человека, экспрессируемого с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hFXI-PKA3-mmh; SEQ ID NO: 25), и домена PKA4 FXI человека, экспрессируемого с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hFXI-PKA4-mmh; SEQ ID NO: 26), совместно реагенты FXI-mmh. Реагенты FXI-mmh, меченые PK (калликреином плазмы крови), имели идентифицированный домен apple, замещенный соответствующим доменом apple PK, что означает, что специфичность связывания определяется отсутствием связывания с соответствующим эпитопом антитела на рекомбинантных белках FXI человека, описанных в данном документе. Например, поскольку hFXI-PKA2-mmh экспрессирует домен apple 2,

меченный калликреином в плазме крови, предполагается, что рассматриваемое mAb связывается только с hFXI-РКА1-mmh, hFXI-РКА3-mmh и hFXI-РКА4-mmh, а не hFXI-РКА2-mmh.

[00235] Реагенты FXI-mmh по отдельности сначала захватывали на наконечники биосенсора ОСТЕТ, покрытые антителом к Penta-His (Pall Fortebio Inc, № в кат. 18-5122) путем погружения наконечников биосенсора на 2 минуты в лунки, каждая из которых содержит 100 нМ раствор реагента FXI-mmh человека. Полученные наконечники биосенсора, захваченные антигеном, затем насыщали по отдельности каждым моноклональным антителом к FXI путем погружения в лунки, содержащие 133 нМ раствор моноклонального антитела к FXI, в течение 180 секунд. Затем наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-ЕТВ между каждым этапом эксперимента. Ответ связывания в реальном времени контролировали в течение всего эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждого этапа. Ответ специфичности связывания моноклонального антитела к FXI сравнивали с различными усеченными реагентами FXI-mmh, как показано в таблице 5.

**Таблица 5:** Моноклональные антитела к FXI, связывающиеся с различными белками домена FXI человека.

mAb к FXI	Ответ в виде связывания с белками FXI человека с добавлением антитела (нМ)				
	hFXI.mmh	hFXI PKA1.mmh	hFXI PKA2.mmh	hFXI PKA3.mmh	hFXI PKA4.mmh
REGN9933	0,83	0,28	-0,12	0,48	0,29
H4H29801P2	0,85	0,31	-0,08	0,52	0,31
отрицательный изотипический контроль [REGN1945]	-0,01	0,04	-0,11	0,03	0,02
mAb сравнения [COMP3448]	0,86	0,26	-0,13	0,44	0,27

Пример 6: Конкурентные анализы

*6.1: Конкурентное связывание домена Apple 2*

[00236] Конкуренцию за связывание между моноклональными антителами к FXI определяли с помощью анализа безмаркерной биослойной интерферометрии в реальном времени на биосенсоре ОСТЕТНТХ (Pall ForteBio Corp., Порт Вашингтон, Нью-Йорк). Весь эксперимент проводили при 25°C в 0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15М NaCl, 0,05% об./об. Поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA (буфер Octet HBS-P) с встряхиванием планшета со скоростью 1000 об./мин. Для оценки того, способны ли какие-

либо 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на FXI человека (ERL) (белок фактора XI из плазмы крови человека, Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, № в кат. HFXI 1111) около 1,5-2,8 нМ моноклонального антитела к FXI человека сначала захватывали на наконечники биосенсора OCTET, покрытые антителом к hFc (АНС) (Pall ForteBio Corp., № 18-5060, Порт Вашингтон, Нью-Йорк), путем погружения наконечников на 5 минут в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора моноклонального антитела к FXI человека (впоследствии называемого первым mAb). Затем захваченные антителом наконечники биосенсора насыщали блокирующим моноклональным антителом изотипа H4H (IgG4 человека) (впоследствии называемым блокирующим mAb) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора блокирующего mAb, в течение 4 минут. Затем наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие сокомплексный раствор 25 нМ hFXI (ERL, № HFXI 1111) и 1 мкМ второго моноклонального антитела к FXI человека (впоследствии называемого вторым mAb), которое предварительно инкубировали в течение 2 часов. Наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-P Octet между каждым этапом эксперимента.

[00237] Ответ связывания в реальном времени контролировали в течение эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждого этапа. Ответ связывания второго mAb, образовавшего предварительный комплекс с FXI человека, с первым mAb корректировали на исходное связывание, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител к FXI.

[00238] В таблице 6 в явном виде определены отношения антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания. В данном случае mAb к FXI REGN9933 конкурирует за связывание с hFXI, полученным из плазмы крови, с H4H29801P2, который, как известно, связывает домен A2 (apple 2) FXI.

**Таблица 6:** Матрица перекрестной конкуренции антител

<b>Первое mAb, захваченное с использованием биосенсоров АНС OCTET</b>	<b>Показано, что вторые антитела mAb конкурируют с первыми mAb</b>
Рассматриваемое mAb к FXI [REGN9933]	H4H29801P2 (связывающее вещество A2)
mAb-2 (связывающее вещество FXI A3-A4)	
H4H29801P2 (связывающее вещество A2)	Рассматриваемое mAb к FXI [REGN9933]

### **6.2: Конкурентное связывание FXI**

[00239] Вторую конкуренцию за связывание между моноклональными антителами к FXI и отрицательным изотипическим контролем осуществляли с использованием следующих материалов и способов.

[00240] **Материалы**

Используемый прибор: Octet HTX 384 RED

Температура: 25°C

Подвижный буфер: HBS-P+1 мг/мл BSA, pH 7,4

Тип датчика: ForteBIO, антитело к hFc

Расход/время захвата: 1000 об./мин., 300 с (mAb-1), 300 с ассоциация (премикс Ag mAb-2), 180 с диссоциация mAb-2

[00241] *Способы*

[00242] Приблизительно 1,5-2,8 нм mAb к  $\alpha$ -FXI человека захватывали путем погружения биосенсоров Octet, покрытых  $\alpha$ -hFc, в лунки, содержащие 50 мкг/мл mAb к  $\alpha$ -FXI человека, в течение 5 минут. H4H hFc (изотипический контроль) использовали в качестве отрицательного контроля. Незанятые датчики  $\alpha$ -hFc Octet насыщали погружением в лунки, содержащие блокирующий раствор mAb (50 мкг/мл Fc человека H4H (изотипический контроль) 1), в течение 4 минут. 25 нМ hFXI (ERL) предварительно инкубировали с 1 мМ mAb к  $\alpha$ -FXI в буфере, содержащем 50 мкг/мл H4H hFc, в течение по меньшей мере 1 часа. Затем насыщенные блокирующими mAb биосенсоры Octet погружали в лунки, содержащие премикс mAb к  $\alpha$ C5 и hC5, в течение 5 минут. В конце каждого цикла датчики  $\alpha$ -hFc Octet регенерировали в 10 мМ HCl. Во время анализа из всей колонки вычитали самостоятельный исходный сигнал (связывание mAb с поверхностью захвата). Связывающие ответы mAb-1 регистрировали, а конкурирующие/неконкурирующие mAb объединяли на основе их соответствующего ответа связывания mAb-2.

[00243] *Результаты и обсуждение*

**Таблица 7:** Перекрестная конкуренция hFXI (ERL) 4 ведущих антител к FXI BST с использованием формата предварительного смешивания (матрица 5×5)

PID mAb	связывающий домен	KD (M)	t1/2 (мин.)	Захват	Блокирование	Рассматриваемое mAb [REGN9933]	mab-1 [H4H29801P2]	mab-2 [Связывающее вещество A3/A4]	Контроль [REGN1945]
Рассматриваемое mAb [REGN9933]	A2	3,51E-11	1008,0	1,97 ± 0,07	0,43 ± 0,01	<b>0,3</b>	0,3*	0,8	0,7
H4H29801P2	A2	4,10E-11	≥ 1155	2,52 ± 0,04	0,46 ± 0,01	0,1*	<b>0,2</b>	0,9	0,7
mAb-2** [связывающее вещество A3/A4]	A3-A4**	1,18E-10	88,9	2,08 ± 0,06	0,42 ± 0,01	1,2	1,4	<b>0,3</b>	0,9

<b>Контроль</b> [REGN1945]	нет	Связ. отсутств.	Связ. отсутств.	1,59 ± 0,06	0,62 ± 0,02	0,3	0,3	0,3	<b>0,2</b>
-------------------------------	-----	--------------------	--------------------	----------------	----------------	-----	-----	-----	------------

\* Конкуренция - двунаправленная

\*\* Конкуренция - однонаправленная

**Таблица 8:** Обобщение связывающих взаимодействий в исследовании перекрестной конкуренции

<b>PID mAb</b>	<b>Связывающий домен</b>	<b>Перекрывающиеся признаки</b>	<b>Уникальная группа эпитопов</b>	<b>Комментарии</b>
Рассматриваемое mAb [REGN9933]	A2	1	A	mAb имеют одну уникальную группу и функцию перекрытия с препаратом сравнения (данные не показаны)
H4H29801P2	A2	1		
mAb-2 [Связывающее вещество A3/A4]	A3-A4	5	F	mAb имеет одну уникальную группу и функцию перекрытия с препаратом сравнения (данные не показаны)

[00244] Рассматриваемые mAb REGN9933 и H4H29801P2 конкурировали двунаправленным образом.

Пример 7: Функциональные анализы плазмы крови времени свертывания крови и образования тромбина (TGA)

[00245] Факторы свертывания крови, наряду с тромбоцитами, являются компонентами крови, важными в процессе гемостаза при повреждении сосудов. Хорошо известно, что эти компоненты являются факторами тромбоза, когда происходит дисбаланс в регуляции (т.е. выработке и/или активности). Считалось, что тромботические заболевания в основном возникают в результате aberrантной активации внешнего пути (посредством тканевого фактора), но в последнее время было обнаружено, что клинические исследования с использованием антисмысловых олигонуклеотидов для предшествующей артропластики коленного сустава F11 предупреждают послеоперационный венозный тромбоз (Büller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, Segers A, Verhamme P, Weitz JI. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. N Engl J Med. 2015 Jan

15;372(3):232-40). Таким образом, ингибирование активности FXI важно для снижения тромботической коагуляции (Weitz JI. Factor XI and factor XII as targets for new anticoagulants. *Thromb Res.* 2016 May;141 Suppl 2:S40-5).

[00246] Этот пример демонстрирует, что антитело к FXI связывает и ингибирует активность FXI человека в четырех функциональных анализах плазмы крови: 1) Активированное частичное тромбопластиновое время (аРТТ), 2) Протромбиновое время (РТ), 3) Анализ образования тромбина (ТГА), инициируемый эллаговой кислотой, и 4) ТГА, инициируемый тканевым фактором. Тест аРТТ оценивает все факторы свертывания внутренних и общих путей каскада коагуляции путем измерения времени образования сгустка после добавления кальция и эллаговой кислоты, тогда как тест РТ оценивает все факторы свертывания внешних и общих путей каскада коагуляции после добавления кальция и тканевого фактора. ТГА, вызванный эллаговой кислотой, измеряет скорость и количество тромбина, образуемого внутренними и общими путями, тогда как ТГА, вызванный тканевым фактором, измеряет скорость и количество тромбина, образуемого внешними и общими путями.

Порядок проведения эксперимента:

[00247] аРТТ определяли на анализаторе гемостаза Diagnostica STAGO Start4 (Daignostica Stago, Парсиппани, Нью-Джерси) следующим образом: в общей сложности 50 мкл объединенной плазмы крови здорового человека добавляли в кювету при 37°C. Через 1 минуту в кювету добавляли 5 мкл 2X серийно разбавленного исследуемого препарата (антитела или низкомолекулярного ингибитора) в PBS и оставляли инкубироваться в течение 5 минут. Затем добавляли 50 мкл эллаговой кислоты APPT-XL (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс) и оставляли инкубироваться в течение 300 секунд, прежде чем добавляли 50 мкл 20 mM хлорида кальция (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс) для начала реакции. Измеренное время образования сгустка для концентрации исследуемого препарата нормализовали к исходному (без лекарственного средства) времени образования сгустка в плазме крови и наносили на график в зависимости от логарифмической молярной концентрации исследуемого препарата. Результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистика) с помощью программного обеспечения PRISM 5 (GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния) для получения концентрации времени удвоения.

[00248] РТ определяли на анализаторе гемостаза Diagnostica Stago START4 (Daignostica Stago, Парсиппани, Нью-Джерси) следующим. в общей сложности 50 мкл объединенной плазмы крови здорового человека добавляли в кювету при 37°C. Через 1 минуту в кювету добавляли 5 мкл 2X серийно разбавленного исследуемого препарата (антитела или низкомолекулярного ингибитора) в PBS и оставляли инкубироваться в течение 5 минут. Затем 100 мкл тканевого фактора (TriniCLOT PT Excel, Diagnostica Stago, Парсиппани, Нью-Джерси, № в кат. T1106) добавляли для начала реакции. Измеренное время образования сгустка для концентрации исследуемого препарата нормализовали к исходному (без лекарственного средства) времени образования сгустка в плазме крови и

наносили на график в зависимости от логарифмической молярной концентрации исследуемого препарата. Результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистика) с помощью программного обеспечения PRISM 5 (GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния) для получения концентрации времени удвоения.

[00249] Профиль образования тромбина при внутреннем пути свертывания крови определяли на автоматической калиброванной тромбограмме Diagnostica Stago (Stago, Парсиппани, Нью-Джерси) следующим образом: в общей сложности 55 мкл объединенной плазмы здорового человека добавляли в лунку микропланшета при 37°C. Затем в лунку микропланшета добавляли 5 мкл 2X серийно разбавленного исследуемого препарата (антитела или низкомолекулярного ингибитора) в PBS и оставляли инкубировать в течение 30 мин. 15 мкл APPT-XL Ellagic Acid (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, № в кат. 95059-804) разводили в реагенте для микрочастиц (MP) (Diagnostica Stago, № в кат. 86222), затем добавляли в лунку и оставляли инкубироваться в течение 45 минут. Затем 15 мкл субстрата Fluo Flu Cal (Diagnostica Stago, № в кат. 86197) добавляли непосредственно перед непрерывным 90-минутным считыванием микропланшета. Измеряемые значения концентрации тромбина в реальном времени наносили на график в зависимости от времени для получения профиля тромбограммы для каждой используемой концентрации исследуемого препарата.

[00250] Профиль образования тромбина при внешнем пути свертывания крови определяли на автоматической калиброванной тромбограмме Diagnostica Stago (Diagnostica Stago, Парсиппани, Нью-Джерси) следующим образом: в общей сложности 55 мкл объединенной плазмы здорового человека добавляли в лунку микропланшета при 37°C. Затем в лунку микропланшета добавляли 5 мкл 2X серийно разбавленного исследуемого препарата (антитела или низкомолекулярного ингибитора) в PBS и оставляли инкубироваться в течение 30 минут. 15 мкл реагента тканевого фактора PPP (Diagnostica Stago, № в кат. 86194) добавляли в лунку и оставляли инкубироваться в течение 45 мин. Затем 15 мкл субстрата Fluo Flu Cal (Diagnostica Stago, № в кат. 86197) добавляли непосредственно перед непрерывным 90-минутным считыванием микропланшета. Измеряемые значения концентрации тромбина в реальном времени наносили на график в зависимости от времени для получения профиля тромбограммы для каждой используемой концентрации исследуемого препарата.

Обобщение результатов и выводы:

[00251] Кривые зависимости ответа от дозы получали для определения влияния каждого лекарственного средства на aPTT и PT в плазме крови. mAb изотипического контроля IgG4 (контрольное моноклональное антитело не оказывало влияния на aPTT (фиг. 1) или PT. REGN9933 продлевало aPTT (фиг. 1) без увеличения PT (не показано). FXI-A2-связывающее сравнительное mAb (mAb сравнения) COMP3448 также продлевало aPTT без увеличения PT.

[00252] Эффективность лекарственного средства для ингибирования коагуляционной активности индексируется произвольной концентрацией «времени

удвоения» или  $C_{2xt}$ , которая представляет собой концентрацию лекарственного средства, необходимую для удлинения времени свертывания в два раза по сравнению с исходным значением. Эти экстраполированные значения  $C_{2xt}$  (т.е. кривые пересекают «линию удвоения времени») для лекарственных средств и контроля, обсуждаемых ниже. REGN9933 достигало  $C_{2xt}$  с  $\leq 33$  нМ для аРТТ (внутренний путь). Было обнаружено, что REGN9933 не удваивает время свертывания РТ (внешний путь) при максимальном тестируемом значении 4 мкМ. mAb сравнения СОМР3448 требовало 62 нМ для достижения аРТТ  $C_{2xt}$ , но не достигало РТ  $C_{2xt}$  в случае с 4 мкМ. Эти данные демонстрируют превосходство REGN9933 в достижении  $C_{2xt}$  со значительно более низкой концентрацией антитела по сравнению с СОМР3448.

[00253] Эффекты этих mAb оценивали по их способности ингибировать образование тромбина (т.е. продленное время до обнаружения тромбина=время задержки, снижение пика тромбина и снижение общего количества генерируемого тромбина=эндогенный потенциал тромбина), когда плазму крови стимулировали эллаговой кислотой или тканевым фактором. Контрольное mAb не влияло на образование тромбина (фиг. 2). Рассматриваемое mAb к FXI/FXIa продемонстрировало небольшое снижение выработки тромбина при 16 нМ, но значительно или полностью ингибировало выработку тромбина при концентрациях  $\geq 31$  нМ (фиг. 3), что указывает на то, что рассматриваемое mAb FXI подавляет активацию внутреннего пути, что, в свою очередь, предупреждает образование тромбина. mAb сравнения продемонстрировало аналогичный ответ, как и у рассматриваемое mAb к FXI/FXIa в отношении образования тромбина с почти полным ингибированием при  $\geq 31$  нМ (фиг. 4).

[00254] На образование тромбина, вызванное тканевым фактором, не влияло mAb изотипического контроля (фиг. 5). Рассматриваемое mAb к FXI/FXIa REGN9933 оказывало незначительное или слабое ингибирующее действие на образование тромбина, вызванное тканевым фактором (фиг. 6). mAb сравнения СОМР3448 оказывало наименьшее влияние на образование тромбина, вызванное тканевым фактором (фиг. 7).

[00255] Концентрации исследуемого препарата, необходимые для увеличения времени задержки в два раза, снижения пика тромбина и общего количества образования тромбина наполовину при активации коагуляции эллаговой кислотой или тканевым фактором, обобщены в таблице 9.

**Таблица 9:** Концентрация лекарственного средства, необходимая для задержки и снижения образования тромбина

	Активация внутреннего пути эллаговой кислотой			Активация внешнего пути тканевым фактором		
	время запаздывания в 2 раза↑	↓ эндогенный потенциал тромбина на 1/2	пик тромбина на 1/2↓	время запаздывания в 2 раза↑	↓ эндогенный потенциал тромбина на 1/2	пик тромбина на 1/2↓
<b>Контрольное mAb</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Рассматриваемое mAb к FXI REGN9933</b>	31 нМ	31 нМ	31 нМ	-	-	-
<b>mAb сравнения COMP3448</b>	31 нМ	31 нМ	31 нМ	-	-	-

(-)=не влияет на образование тромбина в дозе до 500 нМ

Пример 8: Фармакокинетическое исследование рассматриваемого лекарственного вещества в виде антитела к FXI у яванских макаков

[00256] Целью данного исследования было определение фармакодинамических/фармакокинетических (PK/PD) параметров моноклональных антител (mAb) к FXI после внутривенного введения в однократной дозе у яванских макаков в течение 8 недель.

[00257] Самок яванских макаков (n=39) в возрасте 2-4 лет с массой тела 2-4 кг акклиматизировали в лабораторных условиях в течение по меньшей мере 2 недель до начала введения mAb. Животных распределяли в группу введения дозы на основе установленных социальных групп, где использовалась стратифицированная схема рандомизации для включения массы тела одного животного из каждой социальной единицы для распределения животных в исследуемые группы (таблица 8). Животных содержали в стандартных условиях (температура от 18°C до 29°C; относительная влажность от 30% до 70%, соответственно) и поддерживали цикл 12 часов света/12 часов темноты. Пища (печенье PMI LABDIET Fiber-Plus Monkey Diet 5049, LabDiet, Сент-Луис, Миссури) предоставлялась два раза в день, а вода предоставлялась *ad libitum*.

**Таблица 10:** Обобщенная информация о дозах и группах доз

№ группы	Тестируемый или контрольный препарат	Уровень дозы (мг/кг)	Количество самок животных
1	Солевой раствор	0	3
2	mAb сравнения COMP3448	1	3

3		3	3
4		10	3
5	REGN9933	1	3
6		3	3
7		10	3

[00258] Контрольной группе (группа 1) вводили несущую среду (10 мМ гистидин, рН 6,0) внутривенно в объеме 2 мл/кг. Группам 2-7 вводили соответствующие mAb (субъект и препарат сравнения) внутривенно в дозе 1, 3 или 10 мг/кг. Объем дозы 2 мл/кг для каждого животного был основан на самом последнем измерении массы тела. Образцы крови собирали (венозный забор) до и несколько раз в течение 8-недельного периода исследования. Кровь обрабатывали с получением сыворотки крови, чтобы измерить уровни лекарственного средства, и с получением плазмы крови, чтобы измерить как целевые уровни, так и коагуляционную активность.

[00259] Уровни лекарственного средства измеряли в сыворотке крови с использованием иммуноферментного анализа (ELISA) с мышинным антителом к Fc IgG человека в качестве захватывающего mAb и биотинилированной легкой цепью каппа к Ig человека, специфичной в качестве детекторного mAb. Нейтравидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (NeutrAvidin-HRP), использовали для преобразования субстрата на основе люминола в сигнал, пропорциональный концентрации общего mAb к FXI.

[00260] Уровни мишени (FXI) измеряли в плазме крови с использованием набора для ELISA для фактора XI Affinity Biologicals (FXI-AG) (Анкастер, Онтарио), который перекрестно реагирует с FXI обезьян. Для определения концентраций FXI у обезьян соблюдался протокол производителя.

[00261] Коагуляционную активность плазмы крови определяли в функциональных анализах, которые измеряли время свертывания и образование тромбина. Время свертывания определяли с использованием анализатора гемостаза Diagnostica Stago START 4 (Diagnostica Stago, Парсиппани, Нью-Джерси) для измерения активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT), которое измеряет свертывание, активируемое активатором внутреннего пути (эллаговой кислотой), и протромбинового времени (PT), которое измеряет свертывание, активируемое активатором внешнего пути (тканевым фактором). Время до свертывания сообщалось как кратное изменение относительно исходного уровня. Образование тромбина измеряли на калиброванной автоматической тромбограмме Stago Diagnostica (CAT) (Diagnostica Stago, Парсиппани, Нью-Джерси). Анализ образования тромбина (TGA) проводили с использованием активатора внутреннего пути эллаговой кислоты (EA) или активатора внешнего пути тканевого фактора (TF). Данные по TGA представлены в виде процентного изменения по сравнению с исходным уровнем для следующих параметров: время задержки, пиковая концентрация тромбина и общая концентрация тромбина.

Обобщение результатов и выводы:

[00262] Фармакокинетические (PK) параметры оценивали с использованием некомпартментного анализа и популяционного компартментного анализа. Профили зависимости концентрации mAb от времени после внутривенного болюсного введения характеризовались начальной короткой фазой распределения, за которой следовала фаза линейной бета-элиминации и терминальная фаза элиминации, опосредованная мишенью (таблицы 11 и 12). Пропорциональное дозе увеличение mAb  $C_{max}$  наблюдали при внутривенном введении (таблица 13), и было обнаружено, что нормализованная по дозе  $C_{max}$  ( $C_{max}/\text{доза}$ ) была сопоставима между группами введения дозы mAb. Было обнаружено, что экспозиция лекарственного средства ( $AUC_{inf}$ ) при нормализации к дозе ( $AUC_{inf}/\text{доза}$ ) повышается при более высоких дозах, что указывает на более чем пропорциональное дозе повышение экспозиции по группам, что согласуется с нелинейной кинетикой для mAb. Эти наблюдения согласуются с параллельным линейным и нелинейным опосредованным мишенью клиренсом (TMC), в котором наблюдаемое снижение клиренса является функцией повышения дозы. Мишень (FXI) в плазме крови была повышена в около 2-3 раза по сравнению с исходным уровнем у всех животных, за исключением тех, кто получал mAb СОМР3448 (связывающее вещество А2) (таблицы 14 и 15). Более высокие дозы mAb не демонстрировали дозозависимого удерживания целевых концентраций FXI.

[00263] Ингибирующую активность mAb к FXI (рассматриваемый препарат и препарат сравнения) оценивали с помощью функциональных анализов, измеряющих время свертывания плазмы крови или образование тромбина. В каждой временной точке аликвоту плазмы крови использовали для определения времени свертывания, оцененного с помощью анализов активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT) и протромбинового времени (PT), которые измеряют активность свертывания внутренней и внешней коагуляционной активности соответственно. Данные показаны как время свертывания относительно времени свертывания на исходном уровне для aPTT (таблицы 16 и 17) и для PT (таблицы 18 и 19). mAb сравнения и mAb к FXI субъекта продемонстрировали аналогичное 2-кратное удлинение (т.е. ингибирующее действие) по времени свертывания aPTT. На изменение от исходного уровня времени свертывания PT не влияли никакие тестируемые mAb или повышение доз любых mAb.

[00264] Коагуляционную активность также оценивали путем измерения профиля образования тромбина при активации внутренним активатором пути (эллаговой кислотой) или внешним активатором пути (тканевым фактором). Одним из измеряемых параметров кривой образования тромбина было время задержки, которое оценивает время, необходимое для образования тромбина после добавления активатора в плазму крови. Данные выражали кратное изменение от исходного значения времени задержки. Доза mAb 1 мг/кг увеличивала время задержки в приблизительно 2 раза в течение около 7 дней в плазме крови, активированной эллаговой кислотой (таблицы 20 и 21). Время задержки было увеличено в ~3-4 раза по сравнению с исходным временем в течение около 3 недель для доз 3 и 10 мг/кг для mAb при активации эллаговой кислотой. Время задержки не увеличивалось при использовании тканевого фактора в качестве активатора коагуляции (таблицы 22 и 23).

[00265] Вторым параметром, измеренным в анализе образования тромбина, был пик тромбина, который оценивает концентрацию при образовании пиков тромбина. Данные выражали в процентах от исходного пика тромбина. mAb были способны значимо ингибировать пиковые концентрации тромбина (при индуцировании эллаговой кислотой) до около 5-15% от исходного уровня при трех применяемых концентрациях mAb; однако было обнаружено, что эффект был кратковременным (~5 дней) при дозе 1 мг/кг (таблицы 24 и 25). Доза 3 мг/кг снижалась в течение 2 недель, в то время как доза 10 мг/кг mAb снижалась в течение около 4 недель. Влияние mAb на пик тромбина при использовании тканевого фактора в качестве активатора было переменным, поскольку оно повышало и уменьшало пиковые концентрации тромбина на 50% (таблицы 26 и 27).

[00266] Третьим параметром, измеряемым в анализе образования тромбина, был эндогенный потенциал тромбина, который оценивает общую концентрацию тромбина, образующегося во время активности. Данные выражали в процентах от исходного уровня образования общего тромбина. mAb продемонстрировали аналогичный эффект на ингибирование образования общего тромбина, как и при пиковом ингибировании тромбина, когда эллаговую кислоту использовали для активации коагуляции (таблицы 28 и 29). Аналогичным образом, результаты были переменными при использовании тканевого фактора в активаторе (таблицы 30 и 31).

**Таблица 11:** Измеряемая концентрация mAb COMP3448 в плазме крови

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Конц. (мкг/мл)	SEM	Конц. (мкг/мл)	SEM	Конц. (мкг/мл)	SEM
<b>5 мин.</b>	30,37	1,25	97,93	10,08	302,33	9,70
<b>6 ч</b>	26,17	1,59	80,53	5,80	262,33	15,90
<b>1 д</b>	19,57	0,03	59,33	3,07	187,00	14,57
<b>2 д</b>	13,97	0,34	49,03	2,92	152,67	13,02
<b>3 д</b>	11,13	0,29	40,57	2,39	137,33	18,98
<b>5 д</b>	6,06	0,76	34,27	0,67	116,03	11,24
<b>7 д</b>	3,80	0,51	29,43	1,43	102,53	13,58
<b>10 д</b>	1,98	0,31	24,30	1,90	89,00	9,53
<b>14 д</b>	0,86	0,19	15,43	1,83	75,37	7,70
<b>22 д</b>	0,20	0,06	4,14	0,47	50,90	5,52
<b>29 д</b>	0,10	0,00	0,75	0,22	35,40	6,20
<b>36 д</b>	BLQ	BLQ	0,29	0,04	22,03	5,79
<b>43 д</b>	BLQ	BLQ	0,12	0,02	10,95	5,53
<b>50 д</b>	BLQ	BLQ	0,56	0,00	5,63	4,24
<b>57 д</b>	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	4,10	3,30

BLQ=ниже предела количественного определения

**Таблица 12:** Измеряемая концентрация рассматриваемого mAb к FXI REGN9933 в плазме крови

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Конц. (мкг/мл)	SEM	Конц. (мкг/мл)	SEM	Конц. (мкг/мл)	SEM
<b>5 мин.</b>	27,47	0,59	81,10	5,75	284,33	4,18
<b>6 ч</b>	21,73	0,94	64,17	5,40	237,33	7,33
<b>1 д</b>	15,57	0,59	48,97	4,54	180,67	2,03
<b>2 д</b>	11,77	0,41	40,67	2,96	155,67	3,28
<b>3 д</b>	9,60	0,36	34,90	2,80	137,00	1,00
<b>5 д</b>	6,58	0,42	27,57	2,34	116,00	2,52
<b>7 д</b>	4,83	0,29	24,63	2,98	102,70	6,71
<b>10 д</b>	3,13	0,26	18,80	3,55	89,80	6,91
<b>14 д</b>	2,10	0,25	13,21	3,35	76,90	7,61
<b>22 д</b>	1,06	0,18	7,24	2,65	56,37	7,45

29 д	0,60	0,11	3,61	1,42	37,80	6,85
36 д	0,39	0,07	1,95	0,65	25,20	6,57
43 д	0,28	0,05	1,35	0,45	14,93	5,76
50 д	0,25	0,05	1,03	0,35	10,52	4,35
57 д	0,20	0,04	0,77	0,26	6,72	2,77

Таблица 13: Рассчитанные PK параметры для каждого mAb, вводимого i.v.

Параметр	Единица измерения	COMP3448 1 мг/кг				COMP3448 3 мг/кг				COMP3448 10 мг/кг			
		N	Среднее	SD	CV%	N	Среднее	SD	CV%	N	Среднее	SD	CV%
C <sub>max</sub>	мкг/мл	3	30,4	2,16	7,10	3	97,9	17,5	17,8	3	302	16,8	5,56
C <sub>max</sub> /доза	(мкг/мл)/ (мг/кг)	3	30,4	2,16	7,10	3	32,6	5,82	17,8	3	30,2	1,68	5,56
AUC <sub>inf</sub>		3	99,7	7,47	7,50	3	565	65,7	11,6	3	2840	655	23,0
AUC <sub>inf</sub> /доза		3	99,7	7,47	7,50	3	188	21,9	11,6	3	284	65,5	23,0
AUC <sub>inf</sub> %экстр аполированный	%	3	0,591	0,238	40,2	3	0,379	0,346	91,4	3	1,59	2,05	129
t <sub>1/2</sub>	день	3	3,11	0,498	16,0	3	4,12	1,41	34,3	3	8,11	4,43	54,6
CL	мл/день/ кг	3	10,1	0,789	7,84	3	5,36	0,612	11,4	3	3,65	0,847	23,2
Параметр	Единица измерения	Рассматриваемое mAb REGN9933 1 мг/кг				Рассматриваемое mAb REGN9933 3 мг/кг				Рассматриваемое mAb REGN9933 10 мг/кг			
		N	Среднее	SD	CV%	N	Среднее	SD	CV%	N	Среднее	SD	CV%
C <sub>max</sub>	мкг/мл	3	27,5	1,02	3,72	3	81,1	9,96	12,3	3	284	7,23	2,54
C <sub>max</sub> /доза	(мкг/мл)/ (мг/кг)	3	27,5	1,02	3,72	3	27,0	3,32	12,3	3	28,4	0,723	2,54
AUC <sub>inf</sub>		3	123	13,2	10,7	3	553	173	31,3	3	3070	674	21,9
AUC <sub>inf</sub> /доза		3	123	13,2	10,7	3	184	57,7	31,3	3	307	67,4	21,9
AUC <sub>inf</sub> %экстр аполированный	%	3	2,19	0,688	31,5	3	1,73	0,828	47,8	3	3,92	2,98	76,1
t <sub>1/2</sub>	день	3	9,31	0,909	9,77	3	8,92	1,25	14,1	3	12,2	3,31	27,1
CL	мл/день/ кг	3	8,16	0,831	10,2	3	5,81	1,85	31,8	3	3,36	0,736	21,9

	кг												
--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

$C_{\max}$ =максимальная концентрация;  $C_{\max}/\text{доза}$ =нормализованная по дозе  $C_{\max}$ ;  
 $AUC_{\text{inf}}$ =экспозиция;  $AUC_{\text{inf}}/\text{доза}$ =нормализованная по дозе экспозиция;  $AUC_{\text{inf}}\%$   
экстраполированный=экстраполированный процент экспозиции;  $t_{1/2}$ =период полужизни и  
 $CL$ =клиренс

**Таблица 14:** Измеряемая концентрация общего FXI обезьян в плазме крови у животных, которым вводили дозу mAb сравнения COMP3448

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Конц. (мг/мл)	SEM	Конц. (мг/мл)	SEM	Конц. (мг/мл)	SEM
<b>0 мин.</b>	2,13	0,53	2,17	0,11	1,46	0,18
<b>5 мин.</b>	1,38	0,25	1,62	0,19	1,23	0,28
<b>6 ч</b>	1,77	0,39	1,74	0,11	1,34	0,34
<b>1 д</b>	2,36	0,44	2,44	0,10	1,44	0,27
<b>2 д</b>	2,70	0,35	2,49	0,05	1,66	0,35
<b>3 д</b>	2,74	0,38	2,70	0,15	1,79	0,33
<b>5 д</b>	2,77	0,16	2,60	0,36	1,96	0,36
<b>7 д</b>	2,72	0,36	2,48	0,26	1,78	0,33
<b>10 д</b>	2,60	0,40	2,54	0,14	1,90	0,33
<b>14 д</b>	2,41	0,51	2,59	0,15	1,86	0,12
<b>22 д</b>	2,28	0,27	2,57	0,30	2,10	0,39
<b>29 д</b>	2,41	0,55	2,65	0,31	2,14	0,44
<b>36 д</b>	2,04	0,37	2,07	0,14	2,19	0,51
<b>43 д</b>	2,08	0,31	2,02	0,24	2,28	0,60
<b>50 д</b>	1,95	0,36	2,23	0,39	2,72	0,60
<b>57 д</b>	2,30	0,71	2,10	0,36	2,32	0,43

**Таблица 15:** Измеряемая концентрация общего FXI обезьян в плазме крови у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Конц. (мг/мл)	SEM	Конц. (мг/мл)	SEM	Конц. (мг/мл)	SEM
<b>0 мин.</b>	3,75	0,21	2,52	0,66	2,70	0,34
<b>5 мин.</b>	3,19	0,17	2,53	0,78	2,35	0,20
<b>6 ч</b>	3,81	0,10	2,55	0,79	2,49	0,33
<b>1 д</b>	4,24	0,16	3,65	0,86	3,22	0,24

2 д	4,41	0,14	4,00	0,93	3,50	0,33
3 д	4,40	0,07	4,12	1,16	4,05	0,35
5 д	4,65	0,15	4,15	1,05	4,04	0,45
7 д	4,67	0,10	4,22	1,27	3,80	0,64
10 д	4,03	0,31	3,60	0,88	3,78	0,69
14 д	4,24	0,21	3,86	0,95	4,41	0,67
22 д	4,11	0,22	3,54	0,65	3,92	0,54
29 д	4,19	0,21	4,15	0,60	4,74	0,85
36 д	4,12	0,06	3,25	0,29	4,57	0,58
43 д	4,19	0,35	2,98	0,43	4,63	0,53
50 д	3,91	0,48	3,21	0,40	5,20	0,71
57 д	3,65	0,25	2,97	0,15	5,15	1,32

**Таблица 16:** Измеряемая кратность изменения аРТТ у животных, которым вводили дозу mAb сравнения СОР3448

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
0 мин.	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
5 мин.	2,02	0,07	1,95	0,02	2,36	0,06
6 ч	1,81	0,06	2,00	0,08	2,15	0,16
1 д	1,87	0,08	1,92	0,07	2,21	0,16
2 д	1,75	0,11	1,81	0,10	2,23	0,13
3 д	1,74	0,04	1,87	0,07	2,28	0,16
5 д	1,55	0,11	1,88	0,04	2,25	0,18
7 д	1,25	0,10	1,86	0,08	2,32	0,16
10 д	1,11	0,06	1,88	0,07	2,30	0,15
14 д	1,06	0,03	1,84	0,04	2,33	0,13
22 д	1,10	0,05	1,31	0,07	2,26	0,07
29 д	1,06	0,03	1,02	0,01	2,16	0,13
36 д	1,07	0,04	1,00	0,04	2,19	0,17
43 д	1,07	0,04	1,00	0,01	1,71	0,12
50 д	1,05	0,04	1,02	0,01	1,41	0,26
57 д	1,01	0,04	1,01	0,02	1,36	0,21

**Таблица 17:** Измеряемая кратность изменения аРТТ у животных, которым вводили

рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<b>5 мин.</b>	1,84	0,04	2,03	0,10	2,04	0,12
<b>6 ч</b>	1,80	0,03	1,92	0,10	2,01	0,12
<b>1 д</b>	1,75	0,04	1,89	0,10	1,93	0,12
<b>2 д</b>	1,63	0,06	1,92	0,10	1,92	0,11
<b>3 д</b>	1,60	0,04	1,87	0,10	1,89	0,10
<b>5 д</b>	1,28	0,06	1,87	0,08	1,98	0,09
<b>7 д</b>	1,08	0,08	1,97	0,12	2,00	0,12
<b>10 д</b>	1,07	0,09	1,76	0,09	1,97	0,11
<b>14 д</b>	1,04	0,04	1,56	0,18	1,93	0,14
<b>22 д</b>	1,03	0,04	1,29	0,14	1,83	0,09
<b>29 д</b>	1,02	0,03	1,08	0,04	1,83	0,09
<b>36 д</b>	1,04	0,04	1,05	0,01	1,54	0,09
<b>43 д</b>	1,04	0,02	1,05	0,03	1,33	0,18
<b>50 д</b>	1,03	0,04	1,06	0,04	1,11	0,10
<b>57 д</b>	1,01	0,02	1,07	0,03	1,00	0,03

**Таблица 18:** Измеряемая кратность изменения PT у животных, которым вводили дозу mAb сравнения COMP3448

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<b>5 мин.</b>	0,95	0,08	1,01	0,02	1,07	0,01
<b>6 ч</b>	0,93	0,09	1,03	0,01	1,03	0,04
<b>1 д</b>	0,93	0,08	1,02	0,03	1,02	0,05
<b>2 д</b>	0,92	0,08	0,99	0,03	1,03	0,06
<b>3 д</b>	0,90	0,07	1,00	0,01	1,02	0,06
<b>5 д</b>	0,91	0,07	0,98	0,02	1,03	0,04
<b>7 д</b>	0,92	0,08	1,00	0,00	1,07	0,05
<b>10 д</b>	0,96	0,07	1,01	0,01	1,12	0,06

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>14 д</b>	0,94	0,07	1,02	0,02	1,09	0,07
<b>22 д</b>	0,95	0,09	1,01	0,03	1,12	0,04
<b>29 д</b>	0,95	0,08	1,03	0,02	1,10	0,07
<b>36 д</b>	0,93	0,07	1,08	0,02	1,07	0,03
<b>43 д</b>	0,92	0,08	1,03	0,02	1,07	0,03
<b>50 д</b>	0,92	0,08	1,06	0,02	1,04	0,03
<b>57 д</b>	0,91	0,07	1,03	0,02	1,05	0,04

**Таблица 19:** Измеряемая кратность изменения РТ у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<b>5 мин.</b>	1,04	0,01	1,04	0,02	1,00	0,02
<b>6 ч</b>	1,04	0,02	1,03	0,00	1,00	0,02
<b>1 д</b>	1,05	0,03	1,01	0,02	0,98	0,01
<b>2 д</b>	0,98	0,02	0,98	0,02	0,96	0,02
<b>3 д</b>	0,99	0,02	0,99	0,02	0,94	0,01
<b>5 д</b>	0,98	0,03	0,99	0,01	0,97	0,01
<b>7 д</b>	1,08	0,03	1,21	0,10	1,02	0,04
<b>10 д</b>	1,04	0,04	1,03	0,01	0,98	0,06
<b>14 д</b>	1,04	0,03	1,02	0,01	0,97	0,05
<b>22 д</b>	1,04	0,03	1,05	0,01	0,97	0,02
<b>29 д</b>	1,03	0,02	1,10	0,02	0,99	0,03
<b>36 д</b>	1,04	0,02	1,07	0,02	0,99	0,03
<b>43 д</b>	1,05	0,02	1,04	0,01	1,00	0,03
<b>50 д</b>	1,06	0,02	1,06	0,01	1,00	0,01
<b>57 д</b>	1,02	0,00	1,11	0,15	0,98	0,02

**Таблица 20:** Измеряемая кратность изменения времени задержки, вызванная эллаговой кислотой у животных, которым вводили mAb сравнения COM3448

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<b>5 мин.</b>	1,93	0,52	2,07	0,74	2,60	0,53
<b>6 ч</b>	2,00	0,20	2,50	0,38	3,00	1,10
<b>1 д</b>	1,97	0,38	2,47	0,20	2,40	0,06
<b>2 д</b>	1,70	1,00	2,60	0,00	2,97	0,82
<b>3 д</b>	2,25	0,25	3,77	1,04	3,77	1,17
<b>5 д</b>	1,83	0,35	2,93	0,41	2,73	0,43
<b>7 д</b>	1,20	0,10	2,33	0,38	3,53	0,80
<b>10 д</b>	1,00	0,15	2,23	0,48	3,37	0,62
<b>14 д</b>	0,97	0,09	2,77	0,52	3,57	1,03
<b>22 д</b>	0,87	0,09	1,60	0,17	2,63	0,84
<b>29 д</b>	0,83	0,03	1,13	0,12	2,87	0,62
<b>36 д</b>	0,87	0,07	0,93	0,12	3,10	0,75
<b>43 д</b>	0,93	0,03	1,03	0,09	2,40	0,81
<b>50 д</b>	0,90	0,06	1,00	0,00	1,80	0,85
<b>57 д</b>	0,83	0,07	1,10	0,12	1,63	0,74

**Таблица 21:** Измеряемая кратность изменения времени задержки, вызванная эллаговой кислотой у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
<b>5 мин.</b>	2,400	0,361	3,067	0,498	3,100	0,300
<b>6 ч</b>	2,700	0,656	2,367	0,348	3,400	0,200
<b>1 д</b>	3,067	0,463	2,767	0,285	3,033	0,318
<b>2 д</b>	2,600	0,000	2,967	0,033	3,067	0,067
<b>3 д</b>	2,400	0,306	3,500	0,289	3,267	0,384
<b>5 д</b>	1,467	0,167	3,533	0,176	4,300	0,737
<b>7 д</b>	1,500	0,000	3,300	0,173	3,300	0,400
<b>10 д</b>	1,333	0,145	2,767	0,448	2,700	0,346
<b>14 д</b>	1,200	0,058	2,933	0,817	3,667	0,260

<b>22 д</b>	1,050	0,050	1,967	0,581	2,733	0,491
<b>29 д</b>	1,033	0,067	1,300	0,200	3,567	0,353
<b>36 д</b>	0,967	0,088	1,067	0,219	2,100	0,200
<b>43 д</b>	0,967	0,145	1,400	0,400	2,533	0,441
<b>50 д</b>	1,067	0,067	1,267	0,291	2,300	0,569
<b>57 д</b>	0,967	0,033	1,500	0,500	1,533	0,145

**Таблица 22:** Измеряемая кратность изменения времени задержки, вызванная тканевым фактором у животных, которым вводили mAb сравнения COMP3448

	<b>1 мг/кг</b>		<b>3 мг/кг</b>		<b>10 мг/кг</b>	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<b>5 мин.</b>	0,93	0,03	0,93	0,07	0,93	0,07
<b>6 ч</b>	0,90	0,00	0,97	0,03	1,00	0,00
<b>1 д</b>	0,87	0,03	1,00	0,06	0,90	0,06
<b>2 д</b>	0,90	0,10	1,00	0,00	0,87	0,03
<b>3 д</b>	0,95	0,05	1,13	0,03	1,00	0,06
<b>5 д</b>	0,97	0,07	1,07	0,09	1,03	0,03
<b>7 д</b>	0,87	0,03	1,07	0,07	1,03	0,07
<b>10 д</b>	0,97	0,03	0,93	0,03	1,00	0,06
<b>14 д</b>	1,00	0,10	0,97	0,03	1,00	0,06
<b>22 д</b>	0,87	0,09	1,03	0,03	1,03	0,07
<b>29 д</b>	0,93	0,03	0,97	0,03	1,10	0,06
<b>36 д</b>	1,00	0,06	0,97	0,03	1,07	0,03
<b>43 д</b>	0,97	0,03	0,97	0,03	1,03	0,03
<b>50 д</b>	0,97	0,03	0,97	0,03	1,03	0,03
<b>57 д</b>	1,07	0,09	0,97	0,03	1,07	0,03

**Таблица 23:** Измеряемая кратность изменения времени задержки, вызванная тканевым фактором у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	<b>1 мг/кг</b>		<b>3 мг/кг</b>		<b>10 мг/кг</b>	
	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM	Кратность изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
<b>5 мин.</b>	0,97	0,03	0,90	0,06	0,95	0,05

6 ч	0,97	0,12	0,90	0,06	0,97	0,03
1 д	0,93	0,07	0,83	0,03	0,87	0,03
2 д	1,00	0,10	0,83	0,03	0,83	0,09
3 д	0,93	0,07	0,90	0,06	1,00	0,10
5 д	1,13	0,13	0,97	0,03	0,93	0,09
7 д	0,93	0,09	0,93	0,03	0,90	0,06
10 д	1,00	0,06	0,93	0,03	0,97	0,09
14 д	1,03	0,03	0,90	0,00	1,00	0,10
22 д	1,10	0,10	0,97	0,03	1,00	0,06
29 д	1,03	0,03	0,93	0,07	0,97	0,03
36 д	0,93	0,03	0,93	0,03	0,90	0,06
43 д	0,93	0,03	1,00	0,10	1,03	0,07
50 д	1,03	0,03	0,93	0,03	1,10	0,10
57 д	0,97	0,03	1,00	0,10	1,03	0,07

**Таблица 24:** Измеряемый процент изменения образования пика тромбина, индуцированного эллаговой кислотой, у животных, которым вводили mAb сравнения СОР3448

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
0 мин.	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
5 мин.	37,33	15,86	36,00	19,14	28,67	9,21
6 ч	19,50	3,50	14,33	1,45	26,00	12,00
1 д	22,67	6,12	16,00	2,08	20,00	2,65
2 д	47,00	30,00	13,00	0,00	20,67	7,31
3 д	27,00	6,00	9,67	1,86	12,33	3,18
5 д	30,67	3,84	10,67	0,88	22,33	5,46
7 д	84,33	9,77	21,67	6,06	15,67	4,37
10 д	110,00	15,52	19,00	1,53	16,67	2,73
14 д	101,00	10,00	14,33	2,33	18,33	5,36
22 д	108,00	7,57	57,67	17,80	40,00	15,31
29 д	124,00	26,00	96,33	3,76	30,67	6,12
36 д	108,67	13,69	97,33	8,01	26,67	9,61
43 д	98,67	7,31	100,67	2,73	48,67	18,66
50 д	102,33	4,48	99,00	5,51	80,67	31,76

<b>57 д</b>	115,00	14,11	96,33	2,33	82,00	28,01
-------------	--------	-------	-------	------	-------	-------

**Таблица 25:** Измеряемый процент изменения образования пика тромбина, индуцированного эллаговой кислотой, у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	<b>1 мг/кг</b>		<b>3 мг/кг</b>		<b>10 мг/кг</b>	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
<b>5 мин.</b>	22,00	4,62	18,33	7,36	17,00	9,00
<b>6 ч</b>	16,33	2,85	26,00	10,82	16,33	4,26
<b>1 д</b>	14,00	1,53	12,33	1,20	15,67	2,96
<b>2 д</b>	24,50	4,50	17,00	4,93	18,33	6,84
<b>3 д</b>	20,00	2,52	12,00	2,08	17,67	3,18
<b>5 д</b>	65,00	11,02	11,33	2,91	10,33	2,19
<b>7 д</b>	70,00	0,00	14,67	5,21	16,67	4,10
<b>10 д</b>	90,33	1,20	26,67	9,77	21,33	3,67
<b>14 д</b>	91,33	3,38	32,00	22,07	16,33	2,40
<b>22 д</b>	94,00	1,00	59,00	18,77	28,67	10,73
<b>29 д</b>	106,33	6,17	91,00	7,37	22,67	7,80
<b>36 д</b>	102,33	6,64	94,33	1,76	36,67	6,69
<b>43 д</b>	103,67	7,88	97,00	2,00	44,00	11,06
<b>50 д</b>	107,33	4,48	98,33	5,36	68,67	11,46
<b>57 д</b>	101,67	13,64	96,50	0,50	81,33	7,45

**Таблица 26:** Измеряемый процент изменения образования пика тромбина, индуцированного тканевым фактором, у животных, которым вводили mAb сравнения COMP3448

	<b>1 мг/кг</b>		<b>3 мг/кг</b>		<b>10 мг/кг</b>	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
<b>5 мин.</b>	99,67	20,54	127,67	33,51	102,67	15,45
<b>6 ч</b>	106,00	14,00	72,00	12,42	89,50	34,50
<b>1 д</b>	83,33	17,63	89,00	15,95	82,00	4,51
<b>2 д</b>	93,50	41,50	121,00	0,00	81,33	16,42
<b>3 д</b>	103,50	24,50	63,67	3,18	71,00	14,57
<b>5 д</b>	86,33	22,70	66,33	13,12	82,67	9,94
<b>7 д</b>	114,00	27,79	108,00	42,02	64,00	12,01

<b>10 д</b>	121,00	31,19	107,00	17,78	76,00	9,64
<b>14 д</b>	113,00	29,57	88,33	8,97	86,33	18,22
<b>22 д</b>	140,67	28,37	128,33	40,40	116,67	33,63
<b>29 д</b>	137,67	30,68	121,00	2,52	104,33	23,75
<b>36 д</b>	120,67	31,95	149,33	31,87	89,00	18,56
<b>43 д</b>	100,67	23,95	123,00	5,51	99,67	22,05
<b>50 д</b>	120,33	30,02	140,67	20,10	118,67	27,43
<b>57 д</b>	141,00	38,30	126,33	5,67	103,00	17,79

**Таблица 27:** Измеряемый процент изменения образования пика тромбина, индуцированного тканевым фактором, у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	<b>1 мг/кг</b>		<b>3 мг/кг</b>		<b>10 мг/кг</b>	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
<b>5 мин.</b>	90,67	12,73	72,67	21,22	87,50	1,50
<b>6 ч</b>	73,33	18,41	99,33	39,50	89,67	9,91
<b>1 д</b>	67,67	9,56	69,33	2,91	105,33	10,67
<b>2 д</b>	109,50	38,50	80,33	15,21	108,33	14,67
<b>3 д</b>	73,33	6,57	67,33	4,67	110,33	22,52
<b>5 д</b>	67,67	20,80	44,00	7,09	64,00	11,50
<b>7 д</b>	119,67	24,74	57,67	12,47	103,67	17,42
<b>10 д</b>	94,33	12,68	95,33	25,98	118,67	15,17
<b>14 д</b>	125,00	11,15	78,00	22,74	113,00	23,69
<b>22 д</b>	135,50	6,50	101,67	31,26	126,33	10,53
<b>29 д</b>	155,67	11,10	125,33	13,92	120,00	23,86
<b>36 д</b>	126,00	22,12	121,33	37,60	144,00	4,93
<b>43 д</b>	123,33	6,98	135,50	38,50	99,67	3,18
<b>50 д</b>	142,67	18,44	144,33	44,14	135,33	24,04
<b>57 д</b>	143,33	10,49	112,00	38,00	130,67	17,15

**Таблица 28:** Измеряемый процент изменения образования общего тромбина, индуцированного эллаговой кислотой, у животных, которым вводили mAb сравнения СОМР3448

	<b>1 мг/кг</b>		<b>3 мг/кг</b>		<b>10 мг/кг</b>	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00

<b>5 мин.</b>	56,33	13,38	54,00	16,82	58,00	13,61
<b>6 ч</b>	34,00	4,00	31,33	1,67	47,00	5,00
<b>1 д</b>	39,33	8,41	33,00	4,04	46,67	9,96
<b>2 д</b>	62,50	25,50	26,00	0,00	45,33	14,08
<b>3 д</b>	47,00	10,00	21,00	3,79	32,00	5,69
<b>5 д</b>	48,00	3,46	22,33	2,33	49,33	9,96
<b>7 д</b>	94,67	9,53	40,00	9,85	36,33	5,78
<b>10 д</b>	103,67	5,49	38,00	2,89	42,67	7,13
<b>14 д</b>	93,67	3,71	30,67	6,17	43,67	9,94
<b>22 д</b>	98,00	7,51	77,00	19,76	65,67	18,68
<b>29 д</b>	104,67	13,72	94,67	5,21	58,67	1,20
<b>36 д</b>	102,67	9,56	95,33	7,22	51,33	13,17
<b>43 д</b>	92,67	6,12	98,33	4,37	70,00	17,62
<b>50 д</b>	95,67	2,96	98,33	1,67	82,67	18,32
<b>57 д</b>	106,33	14,44	98,67	4,98	90,67	11,33

**Таблица 29:** Измеряемый процент изменения образования общего тромбина, индуцированного эллаговой кислотой, у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
<b>5 мин.</b>	41,33	6,57	37,33	16,59	39,00	16,00
<b>6 ч</b>	30,67	2,19	46,67	15,25	37,00	8,08
<b>1 д</b>	28,33	2,40	29,33	6,49	36,67	7,06
<b>2 д</b>	41,00	4,00	38,00	14,57	39,00	13,11
<b>3 д</b>	36,67	5,36	27,33	6,89	41,33	8,11
<b>5 д</b>	77,00	4,36	25,67	10,14	23,33	4,41
<b>7 д</b>	83,00	0,00	33,33	14,88	38,67	5,33
<b>10 д</b>	88,00	5,51	48,33	17,29	46,00	5,13
<b>14 д</b>	88,67	3,53	44,33	20,04	40,33	5,55
<b>22 д</b>	96,00	3,00	71,67	9,96	55,67	16,71
<b>29 д</b>	99,33	3,33	90,33	3,53	44,00	10,82
<b>36 д</b>	92,33	2,33	90,00	4,51	61,33	9,06
<b>43 д</b>	95,00	5,51	89,00	1,00	71,00	12,66

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>50 д</b>	98,33	4,26	91,67	3,53	89,00	5,51
<b>57 д</b>	92,00	7,55	90,50	3,50	93,67	3,67

**Таблица 30:** Измеряемый процент изменения образования общего тромбина, индуцированного тканевым фактором, у животных, которым вводили mAb сравнения COMP3448

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
<b>5 мин.</b>	97,33	12,33	117,67	18,11	106,67	10,35
<b>6 ч</b>	116,00	4,00	83,33	10,65	92,00	16,00
<b>1 д</b>	84,00	12,12	93,67	13,62	89,00	3,06
<b>2 д</b>	86,00	22,00	123,00	0,00	94,00	9,87
<b>3 д</b>	100,00	26,00	80,00	5,29	84,00	8,14
<b>5 д</b>	86,67	16,18	79,33	15,93	89,33	4,98
<b>7 д</b>	103,67	17,37	106,67	29,04	78,67	5,36
<b>10 д</b>	121,67	31,21	114,67	13,72	91,33	6,64
<b>14 д</b>	110,00	25,36	96,33	6,69	102,00	13,01
<b>22 д</b>	120,33	17,29	118,67	27,76	109,00	18,45
<b>29 д</b>	127,67	22,93	115,00	2,65	107,00	15,04
<b>36 д</b>	113,33	22,93	131,00	16,04	99,33	10,91
<b>43 д</b>	102,00	18,77	118,00	1,15	103,00	13,80
<b>50 д</b>	116,00	19,08	132,33	14,50	114,67	14,90
<b>57 д</b>	135,00	28,68	127,67	4,18	116,67	14,17

**Таблица 31:** Измеряемый процент изменения образования общего тромбина, индуцированного тканевым фактором, у животных, которым вводили рассматриваемое mAb к FXI REGN9933

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
<b>0 мин.</b>	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
<b>5 мин.</b>	106,67	10,49	79,33	17,42	97,00	5,00
<b>6 ч</b>	86,67	12,72	101,67	28,26	97,67	6,94
<b>1 д</b>	80,00	5,51	84,67	4,48	112,00	8,54
<b>2 д</b>	115,00	33,00	90,33	14,68	107,33	11,26

	1 мг/кг		3 мг/кг		10 мг/кг	
	% изменения	SEM	% изменения	SEM	% изменения	SEM
3 д	85,33	5,24	84,00	4,04	113,33	16,59
5 д	74,33	15,86	54,67	9,35	71,00	9,50
7 д	84,00	0,00	72,00	13,89	114,00	15,50
10 д	108,67	15,06	102,33	23,33	128,67	18,50
14 д	130,00	7,81	90,33	19,70	122,33	17,75
22 д	135,00	11,00	102,67	24,54	123,33	4,10
29 д	148,00	4,51	117,33	10,11	119,00	20,79
36 д	120,00	14,42	117,33	28,01	126,33	1,67
43 д	118,33	5,24	125,50	33,50	106,67	6,89
50 д	148,67	11,17	128,67	29,63	132,67	21,50
57 д	137,00	4,00	108,00	32,00	121,67	14,99

Пример 9: ПЕРВИЧНАЯ ФАРМАКОДИНАМИКА

9.1: Фармакология *in vitro*

[00267] Проводили ряд исследований для оценки эффективности и безопасности REGN9933 с использованием анализов *in vitro*. Цели исследований *in vitro* включали: (a) Определение аффинности и специфичности связывания REGN9933 с FXI у человека и отличных от человека видов и FXIа человека; (b) характеристика опосредованной REGN9933 блокады внутренних и внешних путей коагуляции в плазме крови от доноров человека и яванских макаков; (c) оценка иммунных комплексов рассматриваемого mAb REGN9933-FXI и рассматриваемого mAb REGN9933-FXIа для связывания с C1q; и (d) оценка потенциального риска для антитела IgG4P, такого как REGN9933, для индукции пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и высвобождения цитокинов.

[00268] Связывающее взаимодействие между REGN9933 и FXI человека, яванского макака, кролика и мыши или FXIа человека оценивали с использованием анализов на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В этих анализах REGN9933 связывалось с субнаномолярной аффинностью с FXI человека и FXIа и FXI яванского макака. REGN9933 также слабо связывалось с FXI кролика, но не связывалось с FXI мыши (пример 9.1.1).

[00269] Способность REGN9933 блокировать пути коагуляции в объединенной плазме крови от доноров человека или яванского макака оценивали *in vitro* с использованием анализов свертывания крови и анализов образования тромбина (TGA). В этих анализах REGN9933 оказывало зависимое от концентрации действие на внутренний путь коагуляции в объединенной плазме крови человека и оказывало незначительное влияние на внешний путь. REGN9933 также оказывало зависимое от концентрации воздействие на внутренний, но не внешний путь свертывания в объединенной плазме крови

яванского макака (пример 9.1.2.1).

[00270] REGN9933 маловероятно образует иммунные комплексы, способные связывать C1q, поскольку оно содержит стабилизируемый шарниром константный домен кристаллизующегося фрагмента (Fc) тяжелой цепи, полученного из IgG4 (называемый IgG4P), и IgG4 не связывается так же хорошо, как IgG1 с C1q (Patel, 2015). Тем не менее, проводили иммуносорбентный анализ (EIA) для оценки потенциала связывания комплексов REGN9933-FXI и REGN9933-FXIa с C1q. В этом анализе комплексы REGN9933-FXI и REGN9933-FXIa не продемонстрировали положительного связывания с C1q (пример 9.1.2.2).

[00271] Результаты клеточных экспериментов *in vitro* демонстрируют, что антитела IgG4P, которые специфично не нацелены на молекулы поверхности иммунной клетки, такие как REGN9933, имеют низкий потенциал индуцировать высвобождение цитокинов или пролиферацию РВМС (пример 9.1.3).

#### Функциональная характеристика рассматриваемого mAb *in vitro*

9.1.1: Определение кинетических и равновесных параметров связывания для взаимодействия рассматриваемого mAb с FXI от человека, яванского макака, кролика и мыши и FXIa от человека

[00272] В этом исследовании технологию SPR использовали для определения аффинности связывания REGN9933 с белками FXI и FXIa человека, полученными из плазмы крови, и с рекомбинантными белками FXI человека, яванского макака, кролика и мыши, продуцируемыми С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (mmH). FXI человека (E19-V625) имеет 96%, 86% и 79% идентичности аминокислотной последовательности с FXI яванского макака, кролика и мыши соответственно. При 25°C и pH 7,4 различные концентрации растворимых белков FXI или FXIa вводили поверх захваченного поверхностью REGN9933 с последующей фазой диссоциации. Кинетические параметры связывания для белков человека, яванского макака и мыши определяли с использованием модели связывания 1:1 с ограничением переноса массы; аффинность связывания с белком кролика определяли с использованием модели связывания в равновесном состоянии 1:1.

[00273] В тестах с использованием белков человека, полученных из плазмы крови, REGN9933 связывало FXI (hFXI) и FXIa (hFXIa) человека с равновесными константами диссоциации (KD) 14,4 и 141 пМ соответственно (данные не показаны).

[00274] В тестах с использованием полученных белков, продуцируемых с помощью mmH-меток, рассматриваемое антитело к FXI mAb REGN9933 связывало рекомбинантный FXI человека (hFXI.mmH) и яванского макака (*Macaca fascicularis*) (MfFXI.mmH) со значениями KD 144 и 104 пМ соответственно, и демонстрировало слабое, но обнаруживаемое связывание с рекомбинантным FXI кролика (rbFXI.mmH) со значением KD 171 нМ. Рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 не демонстрировало обнаруживаемого связывания с рекомбинантным FXI мыши (mFXI.mmH) до наиболее высокой тестируемой концентрации (50 нМ) (данные не показаны).

9.1.2.1: Оценка *in vitro* способности лекарственного вещества рассматриваемого антитела к FXI блокировать пути свертывания крови в объединенной плазме крови человека или яванского макака

[00275] В этом исследовании способность REGN9933 блокировать пути коагуляции в объединенной плазме крови от доноров человека или яванского макака оценивали *in vitro* с использованием анализов свертывания крови и TGA. В этих анализах коагуляцию индуцировали в плазме крови либо EA, либо TF для измерения влияния REGN9933 на внутренние или внешние пути коагуляции соответственно.

[00276] Обобщенные результаты анализов свертывания и TGA с использованием плазмы крови человека и яванского макака приведены в таблице 32.

Таблица 32: Обобщенные данные о влиянии рассматриваемых mAb к FXI REGN9933 на внутренние и внешние пути коагуляции в плазме крови человека и яванских макаков

Анализ	Параметр	Максимальное изменение по сравнению с исходным уровнем (контроль без антител) <sup>a</sup>			
		Плазма крови человека		Плазма крови обезьян	
		Внутренний путь (индуцированный EA)	Внешний путь (индуцированный TF)	Внутренний путь (индуцированный EA)	Внешний путь (индуцированный TF) <sup>b</sup>
Анализ свертываемости	Кратность увеличения времени свертывания (aPTT с EA; PT с TF)	2,7	1,0	2,1	1,0
	Кратность увеличения времени задержки	4,9	1,0	2,2	0,9
TGA	% пика тромбина	8	86	43	107
	% ETP	28	89	66	111

<sup>a</sup> Максимальное изменение между исследуемыми концентрациями антител (анализы свертывания: от 19 нМ до 1,2 мкМ; TGA: от 16 нМ до 500 нМ)

<sup>b</sup> Зависимые от концентрации изменения не наблюдали ни в анализах свертывания, ни в TGA.

Сокращения: aPTT, активированное частичное тромбопластиновое время; EA,

эллаговая кислота; ETP, эндогенный потенциал тромбина; PT, протромбиновое время; TF, тканевый фактор; TGA, анализ образования тромбина

[00277] В анализах свертывания рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 увеличивало aPTT по сравнению с исходным уровнем (без антитела) в зависимости от концентрации; увеличение до 2,7 и 2,1 раза в плазме крови человека (фиг. 8A) и плазме крови яванского макака (данные не показаны) соответственно наблюдали в диапазоне исследуемых концентраций антител (от 19 нМ до 1,2 мкМ). По оценкам, удвоение aPTT по сравнению с исходным уровнем происходит при 25 нМ и 1,1 мкМ в плазме крови человека и яванского макака соответственно. Никаких изменений PT по сравнению с исходным уровнем не наблюдали ни в плазме крови человека, ни в плазме крови яванского макака при максимальной тестируемой концентрации антител (1,2 мкМ) (фиг. 8B).

[00278] В TGA, где образование тромбина индуцировали EA посредством внутреннего пути в плазме крови человека, рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 увеличивало время задержки образования тромбина до 4,9 раза по сравнению с исходным уровнем (без антитела), снижало пиковые уровни тромбина до 8% от исходного уровня и снижало эндогенный потенциал тромбина до 28% по сравнению с исходным уровнем (фиг. 9A и 9B). Рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 оказывало эти эффекты в зависимости от концентрации с максимальными эффектами, достигаемыми при концентрациях  $\geq 250$  нМ (фиг. 9A). Когда образование тромбина индуцировалось TF посредством внешнего пути, рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 слегка снижало пиковые уровни тромбина до 86% от исходного уровня и снижало эндогенный потенциал тромбина до 89% по сравнению с исходным уровнем (фиг. 9C и 9D). Рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 оказывало эти эффекты в зависимости от концентрации с максимальными эффектами, достигаемыми при концентрациях  $\geq 125$  нМ (фиг. 9C). Не наблюдалось зависимо от концентрации увеличения времени задержки образования тромбина в случае рассматриваемого mAb к FXI REGN9933 до максимальной тестируемой концентрации антитела (500 нМ) (фиг. 9C).

[00279] В TGA, где образование тромбина индуцировали EA посредством внутреннего пути в плазме крови яванского макака, рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 увеличивало время задержки образования тромбина до 2,2 раза по сравнению с исходным уровнем (без антитела), снижало пиковые уровни тромбина до 43% от исходного уровня и снижало эндогенный потенциал тромбина до 66% по сравнению с исходным уровнем (данные не показаны). Рассматриваемое mAb к FXI REGN9933 оказывало эти эффекты в зависимости от концентрации с максимальными эффектами, достигаемыми при концентрациях  $\geq 62$  нМ. Когда образование тромбина индуцировали TF посредством внешнего пути, не наблюдали зависимо от концентрации увеличения времени задержки образования тромбина или снижения пикового тромбина или эндогенного потенциала тромбина в случае рассматриваемого mAb к FXI REGN9933 до максимальной тестируемой концентрации антитела (500 нМ) (данные не показаны).

9.1.2.2: Оценка иммунных комплексов рассматриваемого mAb REGN9933-FXI и -FXIa для связывания с C1q.

[00280] Циркулирующие иммунные комплексы (СІС) образуются путем мультимеризации антитела с растворимым антигеном. Отложение СІС в тканях и последующие воспалительные реакции могут приводить к повреждению тканей в месте отложения. Крупные иммунные комплексы также могут активировать компонент комплемента С1q в сыворотке крови (Rojko, 2014). REGN9933 маловероятно образует иммунные комплексы, способные связывать С1q, поскольку оно содержит стабилизируемый шарниром константный домен Fc тяжелой цепи, полученного из IgG4 (называемый IgG4<sup>P</sup>), и IgG4 не связывается так же хорошо, как IgG1 с С1q (Patel, 2015). Тем не менее, проводили EIA для оценки потенциала связывания рассматриваемого комплекса mAb-FX1 и рассматриваемого комплекса mAb-FX1a с С1q.

[00281] В этом исследовании REGN9933 инкубировали с белком FX1 или FX1a человека и добавляли к С1q, адсорбированному на планшете, с последующим обнаружением с использованием антитела к IgG человека.

[00282] Рассматриваемые комплексы mAb REGN9933-FX1 и mAb REGN9933-FX1a не демонстрировали уровней связывания, считающихся положительными согласно описаниям набора для анализа (данные не показаны). В отличие от этого, связывание С1q обнаруживали для комплекса положительного контроля, термически агрегированного гамма-глобулина человека (HAGG).

9.1.3: Характеристика пролиферации и высвобождения цитокинов *in vitro* после обработки мононуклеарных клеток периферической крови человека антителом изотипического контроля IgG4<sup>P</sup>, не связанным с иммунной клеткой

[00283] Рассматриваемое mAb к FX1 REGN9933 представляет собой антитело IgG4<sup>P</sup>, которое не нацелено на молекулы иммунной клеточной поверхности. Способность такого несвязывающего IgG4<sup>P</sup> индуцировать высвобождение или пролиферацию цитокинов в PBMC человека оценивали с использованием антитела изотипического контроля IgG4<sup>P</sup> [REGN1945].

[00284] Антитело изотипического контроля IgG4<sup>P</sup> [REGN1945] не индуцировало высвобождение или пролиферацию цитокинов PBMC в собственном исследовании (данные не показаны), которое проводили в соответствии с установленными способами, которые обнаруживают пролиферацию PBMC и высвобождение цитокинов, индуцированные суперагонистическим антителом к CD28 (TeGenero TGN1412) (Findlay, 2010) (Vessillier, 2015). В этом анализе оценивали накопление IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-13, IL-4 и IL-12p70 после инкубации PBMC с тестируемым антителом. Суперагонистическое антитело IgG4<sup>P</sup> к CD28 [REGN2329] с первичной последовательностью, идентичной TGN1412 (за исключением замены S228P), и стимулирующее антитело к CD3 (ОКТ3) служили в качестве положительного контроля. Антитело изотипического контроля IgG4<sup>P</sup> [REGN1945] в концентрациях от 0,4 до 10 мкг/мл не влияло на пролиферацию PBMC (данные не показаны) или высвобождение цитокинов (данные не показаны) при любых условиях тестирования. В отличие от этого, антитело положительного контроля к CD28 опосредовало значительную пролиферацию PBMC и значительное высвобождение

цитокинов, в то время как антитело положительного контроля к CD3 опосредовало значительное высвобождение цитокинов.

[00285] Таким образом, антитело IgG4<sup>P</sup>, которое специфично не нацелено на молекулы поверхности иммунной клетки, не индуцировало высвобождение цитокинов или пролиферацию PBMC в стандартных анализах *in vitro*. Это исследование показывает, что антитела IgG4<sup>P</sup>, которые специфично не нацелены на молекулы иммунной клеточной поверхности, имеют низкий потенциал для индуцирования синдрома высвобождения цитокинов у человека.

#### 9.1.4: Обсуждение

[00286] Рассматриваемое m-Ab REGN9933 представляет собой mAb на основе IgG4 человека, которое связывает FXI/FXIa и избирательно ингибирует внутренний путь коагуляции с незначительным воздействием на внешний путь коагуляции в плазме крови человека. Рассматриваемое m-Ab REGN9933 разрабатывается для предупреждения и лечения тромбоэмболических заболеваний. Проводили ряд доклинических исследований для оценки эффективности и безопасности рассматриваемого mAb REGN9933 с использованием анализов *in vitro* и моделей *in vivo*.

[00287] Исследования SPR показали, что рассматриваемое m-Ab REGN9933 специфично связывался с FXI и FXIa человека, а также с FXI яванского макака со значениями KD в пиколярном диапазоне. Рассматриваемое m-Ab REGN9933 также слабо связывалось с FXI кролика с высоким наномолярным значением KD, тогда как связывания с FXI мыши не обнаруживали. Анализы времени свертывания *in vitro* и TGA с использованием объединенной плазмы крови от доноров человека или яванского макака показали, что рассматриваемое m-Ab REGN9933 блокировало активность внутреннюю пути свертывания с зависимым от концентрации эффектом на продолжительность, но не величину. Наблюдали незначительные эффекты на активность внешнего пути коагуляции в плазме крови человека и отсутствие влияния на активность внешнего пути коагуляции в плазме крови яванских макаков. Вместе эти исследования связывания и активности *in vitro* продемонстрировали, что рассматриваемое m-Ab REGN9933 способно связывать FXI и блокировать активность внутреннего пути свертывания в плазме крови человека и обезьян, тем самым поддерживая использование яванского макака в качестве релевантного вида для фармакологических и/или токсикологических исследований с рассматриваемым m-Ab REGN9933.

[00288] В EIA *in vitro* комплексы рассматриваемого m-Ab REGN9933-FXI и рассматриваемого m-Ab REGN9933-FXIa не демонстрировали положительных уровней связывания с C1q, что позволяет предположить, что m-Ab субъекта REGN9933 обладает низким потенциалом индуцировать опосредованные иммунным комплексом воспалительные ответы.

#### 9.2: Фармакология *in vivo*

[00289] Опосредованную рассматриваемым m-Ab REGN9933 блокаду пути коагуляции у яванских макаков оценивали в пилотном PK/PD исследовании, в котором

оценивали однократную IV дозу 1, 3 или 10 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 (пример 9.2.1), и в исследовании, в котором оценивали однократную дозу 0,5, 5 или 30 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 IV путем или 30 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 SC путем (пример 9.2.2).

[00290] Опосредованную REGN9933 блокаду пути свертывания оценивали в анализах свертывания и TGA с использованием плазмы крови яванских макаков, которые получали однократную IV дозу 1, 3 или 10 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 (пример 9.2.1), и в TGA с использованием плазмы крови яванских макаков, которые получали однократную дозу 0,5, 5 или 30 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 внутривенным (IV) путем или 30 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 подкожным (SC) путем (пример 9.2.2). В анализах свертывания крови, проведенных в каждом из вышеупомянутых исследований, REGN9933 оказывало PD эффекты на внутренний путь свертывания крови (т.е. продленное активированное частичное тромбопластиновое время [aPTT] по сравнению с исходным уровнем) без влияния на внешний путь свертывания крови (т.е. без влияния на протромбиновое время [PT] по сравнению с исходным уровнем). При проведении TGA рассматриваемое m-Ab REGN9933 оказывало PD эффекты на внутренний путь свертывания крови (т.е. продленное время задержки образования тромбина, снижение пиковых уровней тромбина и снижение эндогенного потенциала тромбина, индуцированного эллаговой кислотой [EA] по сравнению с исходным уровнем) с минимальными эффектами на внешний путь свертывания крови (т.е. отсутствие влияния на время задержки образования тромбина и незначительное снижение пиковых уровней тромбина и эндогенного потенциала тромбина, индуцированного тканевым фактором [TF] по сравнению с исходным уровнем). В обоих исследованиях продолжительность эффектов на внутренний путь свертывания крови (наблюдаемых в анализах свертывания крови и TGA) была дозозависимой, тогда как незначительные эффекты на внешний путь свертывания крови (наблюдаемые в TGA) не были дозозависимыми. Влияние на внутренний путь свертывания крови, вероятно, было обусловлено повышением концентраций рассматриваемого m-Ab REGN9933 у субъекта, а не снижением концентраций FXI.

9.2.1: Оценка *ex vivo* однократных доз 1, 3 или 10 мг/кг рассматриваемого mAb IV в отношении активности коагуляционного пути у яванских макаков (R3448 PK 19085)

[00291] Характеристика опосредованной рассматриваемым m-Ab REGN9933 блокады пути коагуляции у яванских макаков оценивали в рамках PK исследования однократной дозы (данные не показаны). Самкам яванских макаков вводили однократную IV медленную болюсную инъекцию несущей среды (контроль) или рассматриваемого m-Ab REGN9933 в дозах 1, 3 или 10 мг/кг (n=3 на группу) и контролировали в течение 8 недель после введения дозы. Образцы крови собирали у всех животных до введения дозы и через 5 минут, 6 часов, в день 2, день 3, день 4, день 6, день 8, день 11, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50 и день 57 после введения дозы. Измерения перед введением дозы служили исходным уровнем для каждого животного. Концентрации общего

рассматриваемого m-Ab REGN9933 (все лекарственное средство, независимо от присутствия мишени) в сыворотке крови и общего FXI (рассматриваемое m-Ab REGN9933 - связанное и свободное) в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Различные PD анализы проводили с использованием образцов плазмы крови, которые включали измерение влияния рассматриваемого m-Ab REGN9933 на путь свертывания крови с использованием анализов свертывания крови и TGA. В этих анализах коагуляцию индуцировали в образцах плазмы крови либо EA, либо TF для измерения влияния рассматриваемого m-Ab REGN9933 на внутренние или внешние пути коагуляции соответственно. Концентрации общего FXI, а также измерения из анализов свертывания крови и TGA нормализовали к исходному уровню (т.е. измерениям до введения дозы) и выражали в виде изменения по сравнению с исходным уровнем.

9.2.1.1. Оценка влияния рассматриваемого mAb REGN9933 на общие уровни FXI в плазме крови

[00292] Профили концентрация-время общего уровня рассматриваемого m-Ab REGN9933 характеризовались начальной короткой фазой распределения, за которой следовала короткая линейная фаза бета-элиминации и терминальная фаза элиминации, опосредованная мишенью. Пиковые концентрации рассматриваемого m-Ab REGN9933 увеличивались пропорционально дозе, в то время как экспозиции рассматриваемого m-Ab REGN9933, нормализованные по дозе, указывали на увеличение экспозиции более чем пропорционально дозе во всех группах доз (фиг. 10A).

[00293] Увеличение общего FXI по сравнению с исходным уровнем наблюдалось при дозах рассматриваемого m-Ab REGN9933  $\geq 3$  мг/кг. Статистически значимое увеличение общего FXI по сравнению с исходным уровнем наблюдали только в группе, получавшей 10 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933, по сравнению с контрольной группой (фиг. 10B). Эти увеличения были ассоциированы с более чем пропорциональными дозе повышениями экспозиции к общему уровню рассматриваемого m-Ab REGN9933 в группах введения дозы. Рассматриваемое m-Ab REGN9933 не было ассоциировано со снижением концентраций общего FXI в плазме крови, вероятно, вследствие стабилизации FXI в кровотоке путем связывания с рассматриваемым m-Ab REGN9933.

9.2.1.2: Оценка влияния рассматриваемого m-Ab REGN9933 на aPTT и PT в плазме крови

[00294] Рассматриваемое m-Ab REGN9933 продлевало активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT), показатель активности внутреннего пути, по сравнению с исходным уровнем при всех исследуемых уровнях дозы, с дозозависимым эффектом на продолжительность активности. Никакого влияния на протромбиновое время (PT), показатель активности внешнего пути, по сравнению с исходным уровнем не наблюдали в случае рассматриваемого m-Ab REGN9933 при любом тестируемом уровне дозы (фиг. 11B).

9.2.1.3: Оценка влияния REGN9933 на образование тромбина в плазме крови

[00295] В TGA, индуцированном EA (TGA-EA), рассматриваемое m-Ab REGN9933 продлевало время задержки образования тромбина (данные не показаны), снижало пиковые

уровни тромбина (данные не показаны) и снижало эндогенный потенциал тромбина (фиг. 12A), опосредованные внутренним путем, по сравнению с исходным уровнем, при всех исследуемых уровнях дозы, с дозозависимым эффектом на продолжительность активности. В TGA, индуцированном TF (TGA-TF), не наблюдали влияния на время задержки образования тромбина, опосредованное внешним путем, по сравнению с исходным уровнем, в случае рассматриваемого m-Ab REGN9933 при любом тестируемом уровне дозы (данные не показаны). Рассматриваемые дозы m-Ab REGN9933 снижали пиковые уровни тромбина (данные не показаны) и эндогенный потенциал тромбина (фиг. 12B), опосредованные внешним путем, по сравнению с исходным уровнем, при всех тестируемых уровнях доз. Однако эффекты рассматриваемого m-Ab REGN9933 на внешний путь были меньше по величине по сравнению с эффектами на внутренний путь, и ни величина, ни продолжительность эффектов на внешний путь, по-видимому, не были дозозависимыми.

[00296] Статистически значимые эффекты на внутренний путь свертывания крови по сравнению с исходным уровнем, измеренные в TGA, наблюдались до дня 6, дня 11 и дня 50 в группах 1, 3 и 10 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 соответственно, по сравнению с контрольной группой (данные не показаны). Все параметры вернулись к исходным или близким к исходным уровням к концу 8-недельного исследования.

9.2.2: Оценка *ex vivo* однократных доз 0,5, 5 или 30 мг/кг рассматриваемого mAb REGN9933 IV или 30 мг/кг рассматриваемого mAb REGN9933 SC на активность коагуляционного пути у яванских макак

[00297] Проводили PK/PD исследование у самок яванских макак (данные не показаны). Анализы *ex vivo* проводили для оценки влияния рассматриваемого m-Ab REGN9933 на коагуляцию с использованием образцов крови, собранных в течение 10-недельного периода мониторинга. Рассматриваемое m-Ab REGN9933 вводили в виде однократной дозы животным в дозе 0,5, 5 или 30 мг/кг (n=5 на группу) IV или 30 мг/кг (n=5 на группу) SC.

#### **9.2.2.1: Оценка влияния рассматриваемого m-Ab REGN9933 на общие уровни FXI в плазме крови**

[00298] Профили концентрация-время общего уровня рассматриваемого m-Ab REGN9933 характеризовались начальной короткой фазой распределения, за которой следовала короткая линейная фаза бета-элиминации, терминальная фаза элиминации, опосредованная мишенью, и фаза элиминации, опосредованная мишенью (данные не показаны). Пиковые концентрации рассматриваемого m-Ab REGN9933 увеличивались пропорционально дозе (данные не показаны). Более чем пропорциональное дозе увеличение нормализованных по дозе экспозиций рассматриваемого m-Ab REGN9933 наблюдалось во всех группах доз, что согласуется с нелинейной кинетикой, которая более выражена при низких дозах и концентрациях рассматриваемого m-Ab REGN9933 (данные не показаны). Эти результаты согласуются с наблюдаемым снижением клиренса при повышении дозы и ассоциированных с ней концентраций. После введения рассматриваемого m-Ab REGN9933 концентрации растворимого FXI в плазме крови

увеличились в 1,0-1,9 раза во всех группах введения дозы (IV и SC) по сравнению с исходными уровнями, что указывает на наличие эффекта лекарственного средства по сравнению с исходным уровнем. Однако корреляции с концентрациями рассматриваемого m-Ab REGN9933 в сыворотке крови не наблюдали (данные не показаны).

### **9.2.2: Оценка влияния рассматриваемого m-Ab REGN9933 на aPTT и PT в плазме крови**

[00299] Анализы времени свертывания *ex vivo* проводили с использованием плазмы крови из образцов крови, собранных с течением времени, для определения влияния введения рассматриваемого m-Ab REGN9933 на aPTT, индикатор активности внутреннего пути, и на PT, индикатор активности внешнего пути. Отбор образцов крови до дня 3 проводили с использованием неправильного антикоагулянта, этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), в то время как отбор образцов с дня 3 по день 71 проводили с использованием предпочтительного антикоагулянта, цитрата натрия, который меньше мешает проведению анализов свертывания крови. Таким образом, наносили на график только значения, полученные для образцов крови с дня 3 по день 71, и вместо специфического для исследования измерения до введения дозы в анализах свертывания крови, комбинированные значения из этого и предыдущего PK/PD исследования у яванских макаков (данные не показаны) использовали для определения исторического исходного уровня для aPTT и PT.

[00300] Среднее значение aPTT у рассматриваемого m-Ab REGN9933 увеличилось в 1,5-2,1 раза по сравнению с историческим исходным уровнем с дозозависимым влиянием на продолжительность активности, но с аналогичной величиной во всех тестируемых группах введения дозы (данные не показаны). Хотя первое увеличение aPTT в  $\geq 1,5$  раза по сравнению с историческим исходным уровнем наблюдали в день 3 для всех уровней дозы, этот эффект наблюдали в течение возрастающей продолжительности 1, 19 или 54 дней при повышении уровней дозы 0,5 мг/кг (IV), 5 мг/кг (IV) и 30 мг/кг (IV) рассматриваемого m-Ab REGN9933 соответственно. Кроме того, наблюдалось  $\geq 1,5$ -кратное увеличение aPTT по сравнению с историческим исходным уровнем в течение 47 дней после введения дозы 30 мг/кг (SC) рассматриваемого m-Ab REGN9933. Во всех группах введения дозы максимальный средний эффект составлял 2,1-кратное увеличение продления aPTT.

[00301] Никакого влияния на PT по сравнению с исходным уровнем в анамнезе не наблюдали в случае рассматриваемого mAb REGN9933 при любом тестируемом уровне дозы (данные не показаны).

### **9.2.3: Обсуждение**

[00302] Опосредованную рассматриваемым m-Ab REGN9933 блокаду пути свертывания оценивали в анализах свертывания и TGA с использованием плазмы крови яванских макаков, которые получали однократную IV дозу 1, 3 или 10 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933, и в TGA с использованием плазмы крови яванских макаков, которые получали однократную дозу 0,5, 5 или 30 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 IV или 30 мг/кг рассматриваемого m-Ab REGN9933 SC. В анализах свертывания крови,

выполненных в каждом из вышеупомянутых исследований, рассматриваемое m-Ab REGN9933 блокировало внутренний путь коагуляции с дозозависимым эффектом на продолжительность, но не величину; никакого влияния на внешний путь коагуляции не наблюдали. В выполненных TGA рассматриваемое m-Ab REGN9933 блокировало внутренний путь коагуляции с дозозависимым эффектом на продолжительность, но не величину; наблюдали минимальные эффекты на внешний путь коагуляции.

**Пример 10: Фармакология безопасности**

[00303] Конечные точки фармакологической безопасности включали в токсикологическое исследование GLP с многократными дозами, проведенное на яванских макаках (данные не показаны). При дозах до 100 мг/кг/неделя (SC или IV), наиболее высокой вводимой дозе, не наблюдали никаких связанных с исследуемым препаратом изменений сердечно-сосудистой (частота сердечных сокращений, артериальное давление и электрокардиография), дыхательной (количество вдохов/минута и пульсоксиметрия) или центральной нервной системы.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с доменом apple 2 (A2) фактора свертывания крови XI (FXI), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3, где

- (a) HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- (b) HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;
- (c) HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (d) LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (e) LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
- (f) LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или

где

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что HCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 3, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 13, или

при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 31, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 13.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, отличающиеся тем, что HCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 13, или

при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 31, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 13.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с доменом apple 2 (A2) фактора свертывания крови XI (FXI), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 13, или переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 13.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, отличающиеся тем, что HCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 3, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 13, или

при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 31, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 13.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4 или 5, содержащие:

- (a) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- (b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;
- (c) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (d) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (e) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
- (f) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или содержащие

HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

7. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что связывают FXI человека с  $K_D$  менее чем около 1000 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, отличающиеся тем, что связывают FXI человека с  $K_D$ , выбранным из группы, состоящей из менее чем около 800 пМ, менее чем около 500 пМ, менее чем около 100 пМ или менее чем около 50 пМ, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

9. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что связывают FXI человека с

диссоциативным периодом полувыведения ( $t_{1/2}$ ), выбранным из группы, состоящей из более чем около 10 минут, более чем около 60 минут, более чем около 500 минут или более чем около 1000 минут, измеренным с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что ингибируют активацию фактора свертывания крови человека X (FX) с  $IC_{50}$  менее чем около 10 нМ.

11. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что ингибируют активацию фактора свертывания крови человека X (FX) со значением  $IC_{50}$  менее чем около 40 пМ.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что увеличивают по меньшей мере в два раза активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT).

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, отличающиеся тем, что не увеличивают протромбиновое время (PT).

14. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что ингибируют активность тромбина, опосредованную FXIa, на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или 5%-15%.

15. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что удлиняют aPTT по меньшей мере в два раза в плазме крови человека в концентрации  $\leq 100$  нМ,  $\leq 75$  нМ или  $\leq 50$  нМ.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, отличающиеся тем, что не удлиняют PT.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что ингибируют продуцирование или активацию тромбина посредством внутреннего пути коагуляции в плазме крови человека в концентрации по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 25 нМ или по меньшей мере 50 нМ, не влияя на продуцирование или активацию тромбина посредством внешнего пути коагуляции.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурирует за связывание с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из предшествующих пунктов.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают тот же эпитоп, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

21. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотидную

последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19.

22. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 21.

23. Клетка, содержащая вектор по п. 22 или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 21.

24. Способ ингибирования биологической активности, опосредованной FXI, включающий:

приведение в контакт FXI или FXIa с биологически эффективным количеством антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-19 или фармацевтической композиции по п. 20.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что биологическая активность представляет собой тромбогенез, и при этом тромбогенез ингибируется при контакте FXI с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что контакт приводит к продлению aPTT или снижению активности тромбина в плазме крови.

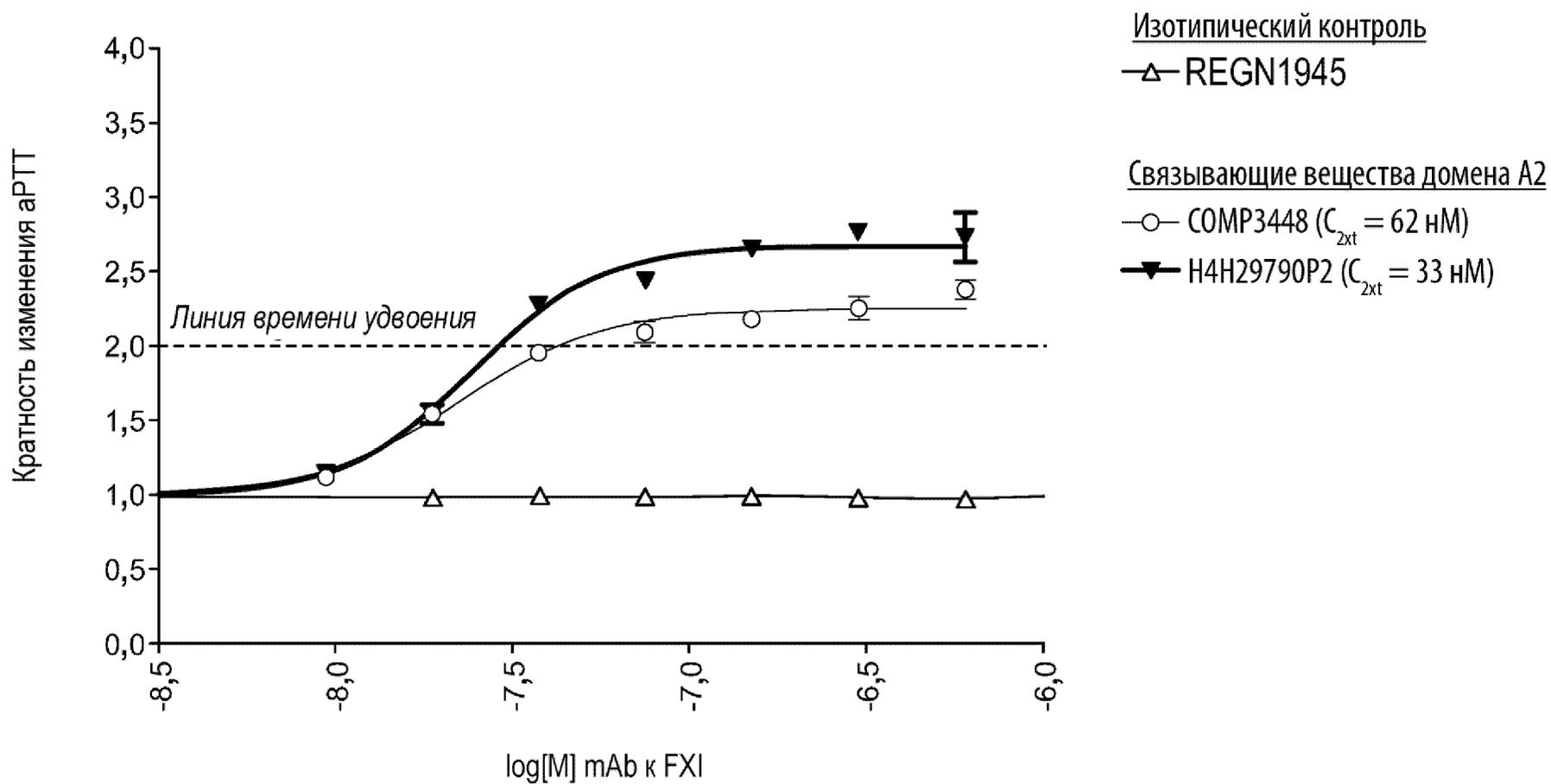
27. Способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией FXI, или облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением, ассоциированным с активностью или экспрессией FXI, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-19 или фармацевтической композиции по п. 20 субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение свертывания крови или заболевание или нарушение, которое обеспечивает повышенный риск тромбогенеза у субъекта.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой фибрилляцию предсердий.

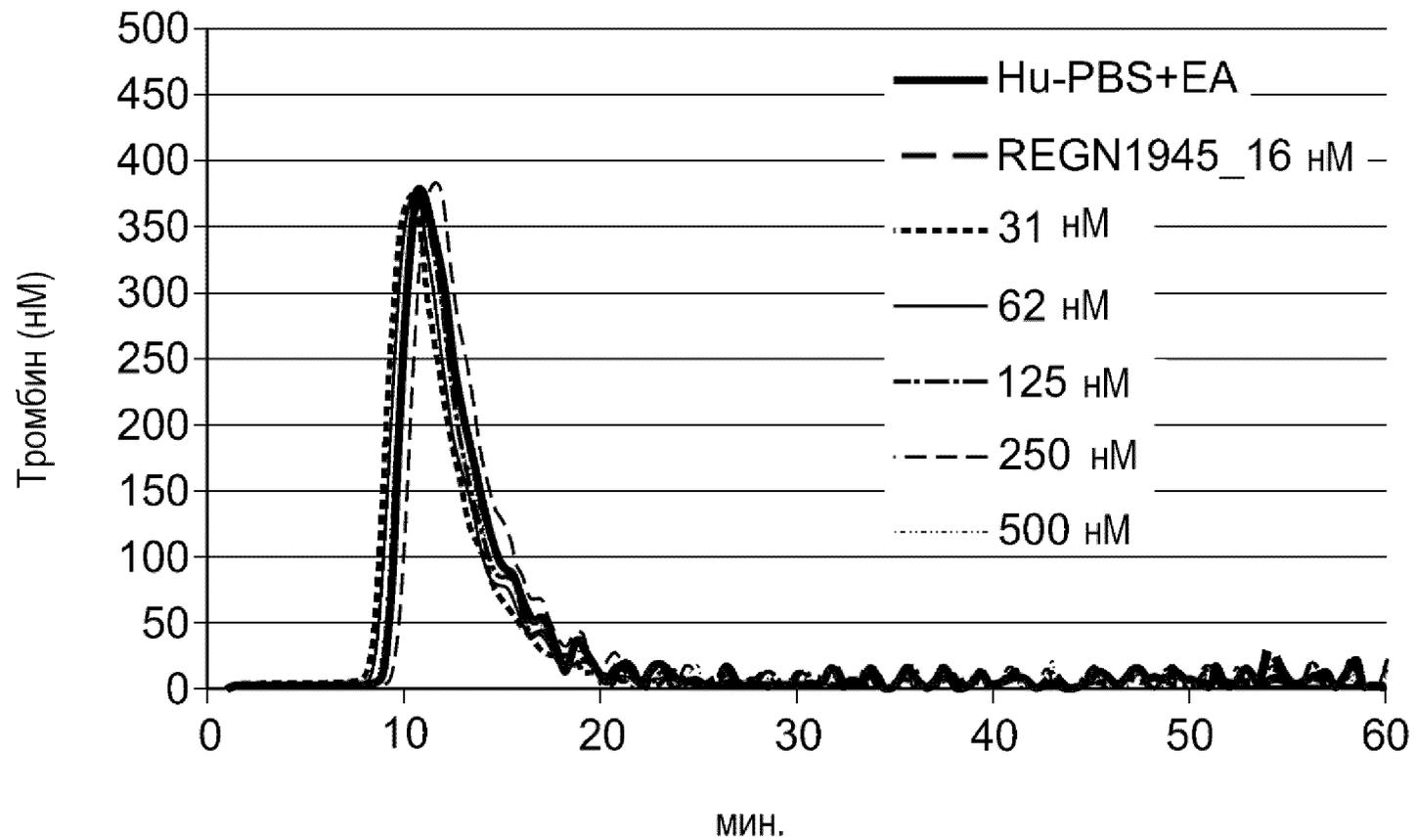
По доверенности

Ответ mAb к FXI/FXIa в зависимости от дозы в отношении aPTT в плазме крови человека



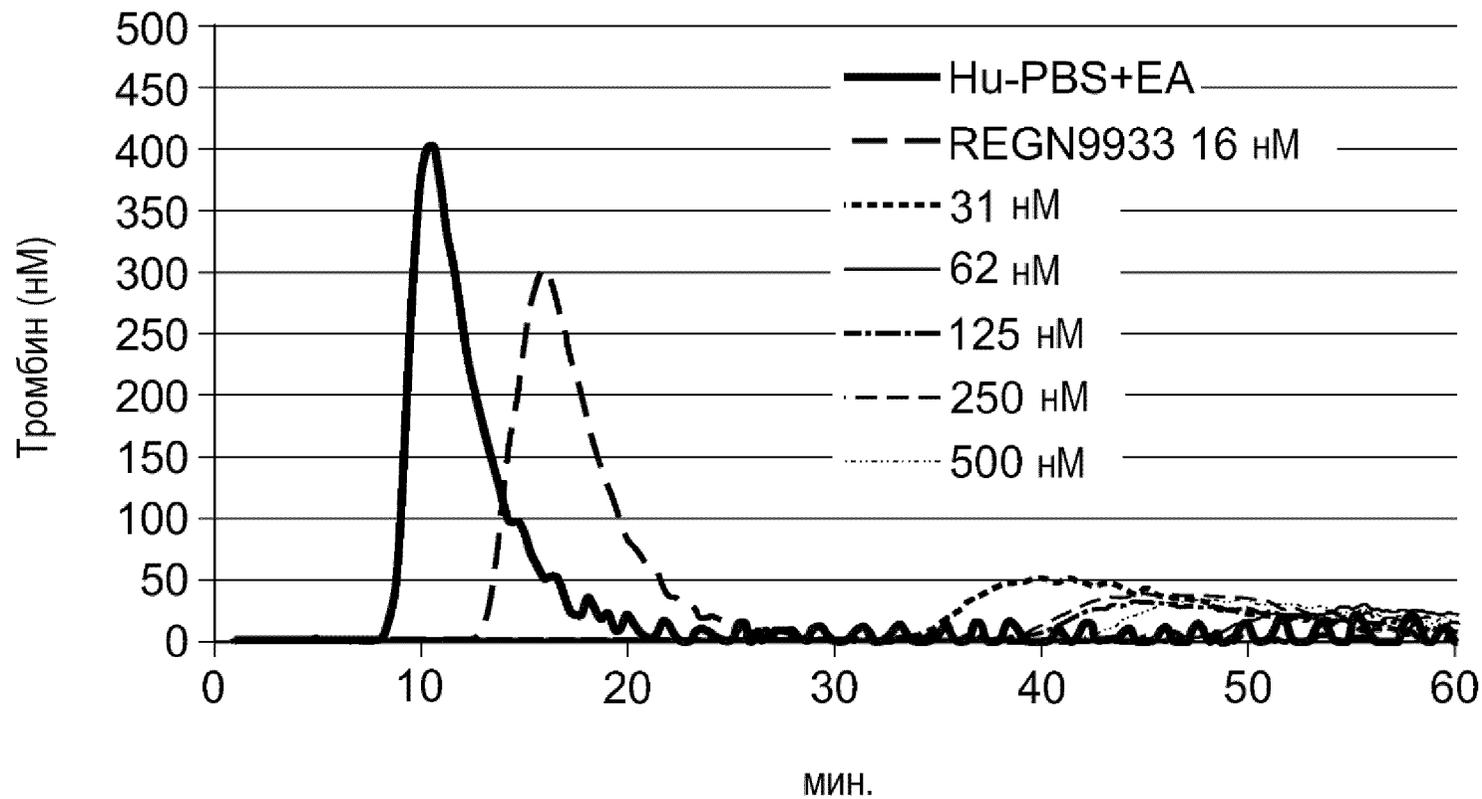
Фиг. 1

REGN1945 (изотипический контроль)



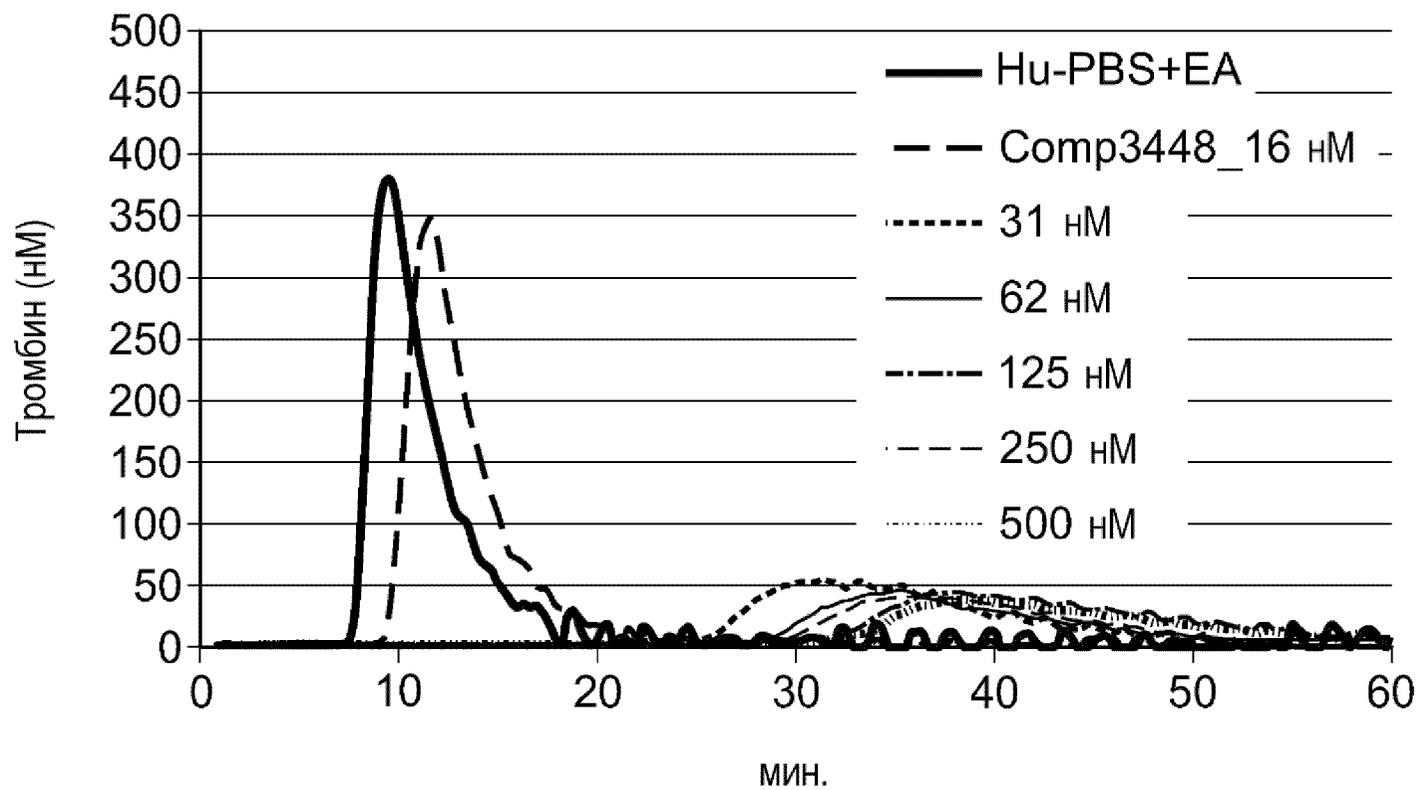
Фиг. 2

REGN9933 (связывающее вещество A2)



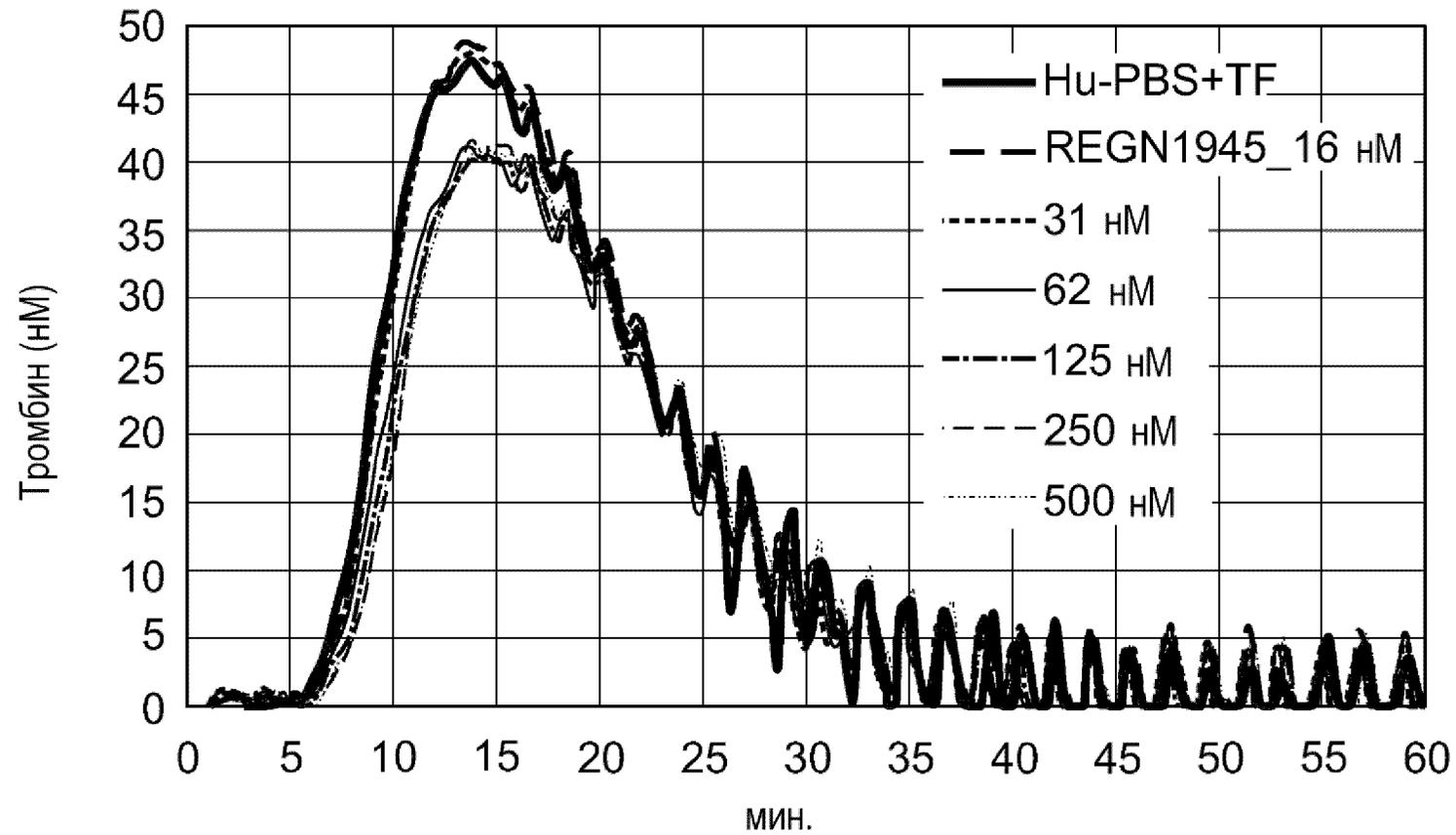
Фиг. 3

COMP3448 (связывающее вещество A2)



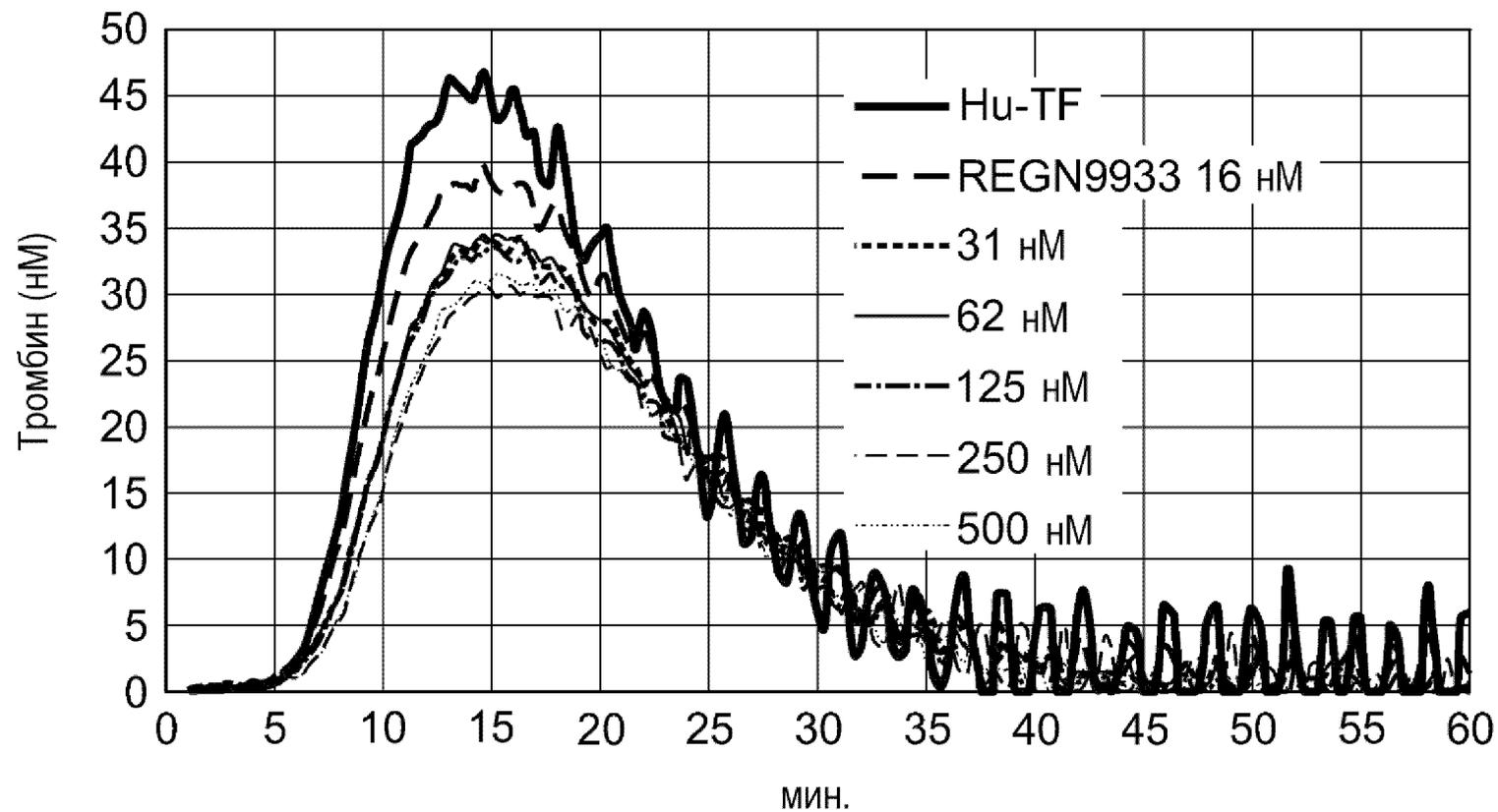
Фиг. 4

REGN1945 (изотипический контроль)



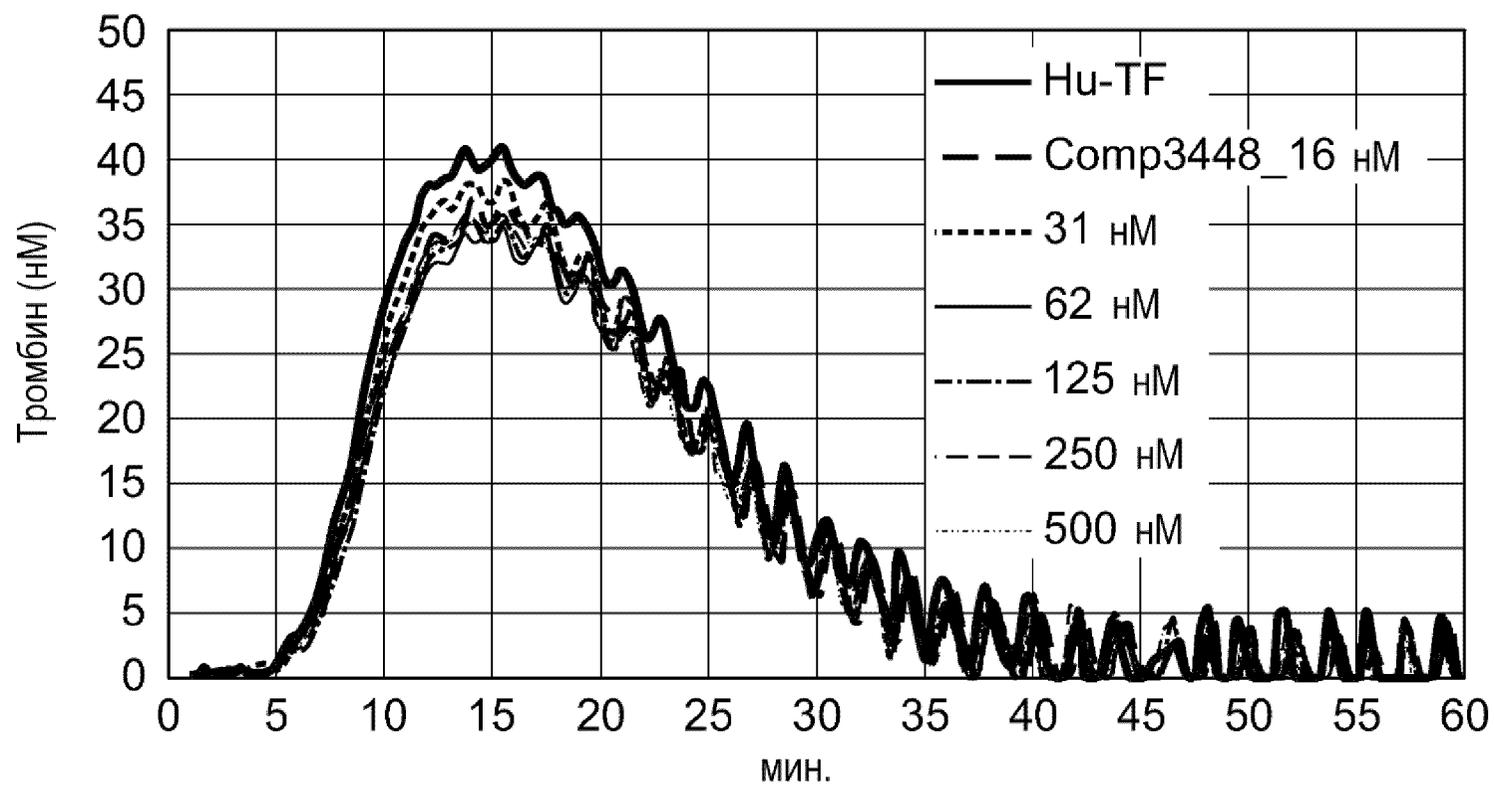
Фиг. 5

REGN9933 (связывающее вещество A2)



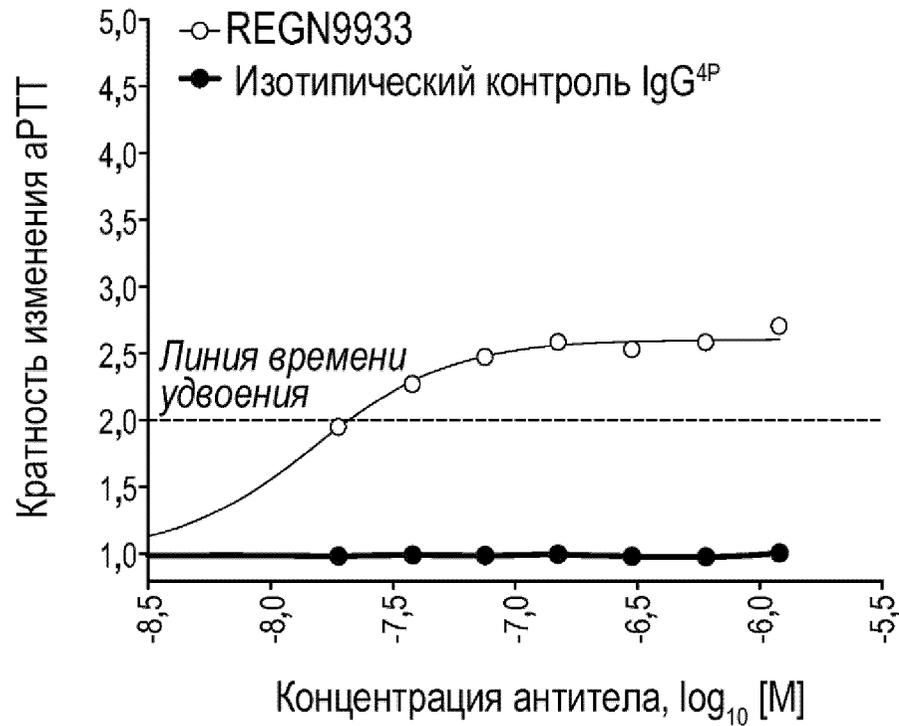
Фиг. 6

COMP3448 (связывающее вещество A2)



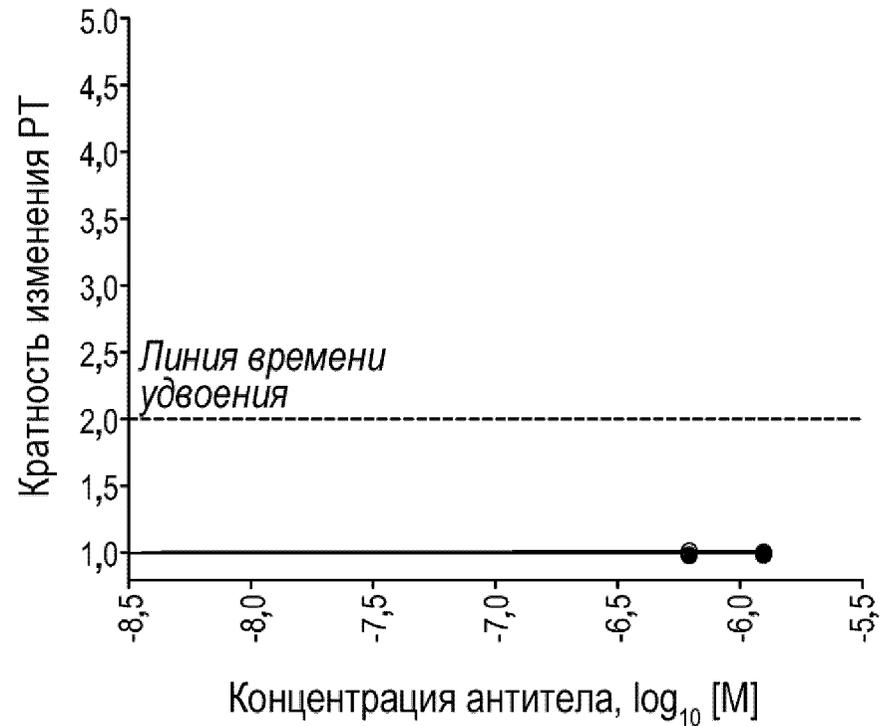
Фиг. 7

аРТТ в плазме крови человека



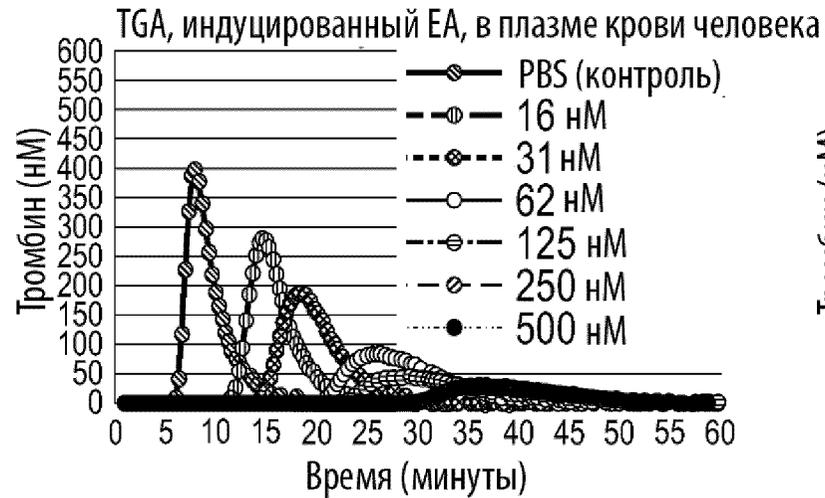
Фиг. 8А

РТ в плазме крови человека

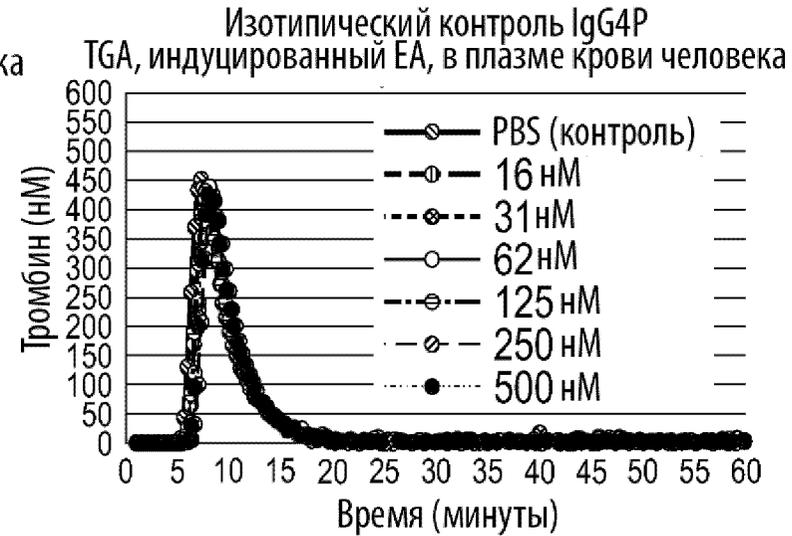


Фиг. 8В

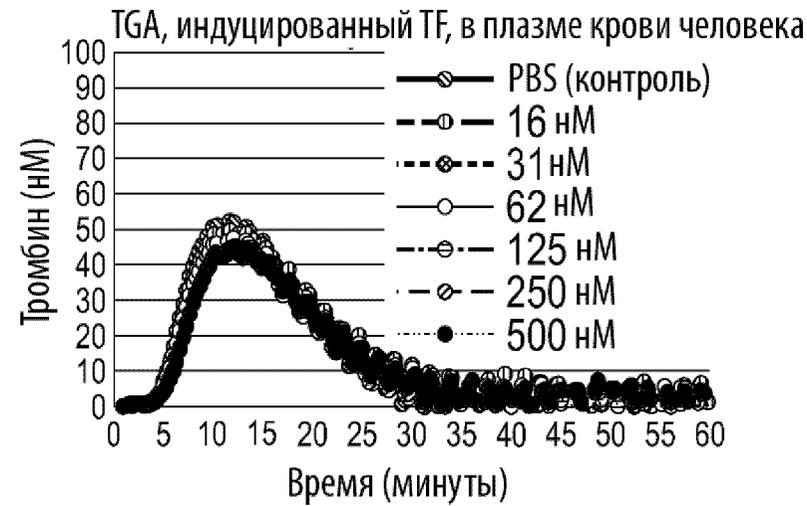
Фиг. 9А  
REGN9933



Фиг. 9В

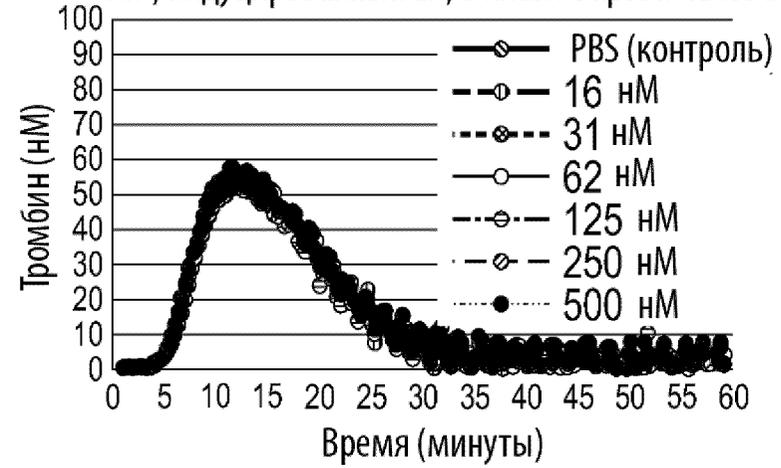


REGN9933

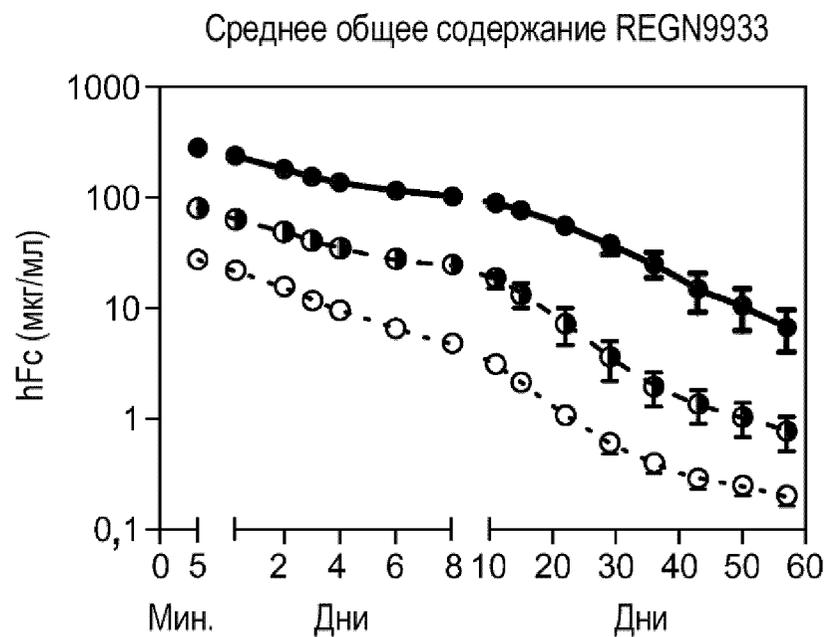


Фиг. 9С

Изотипический контроль IgG4P  
TGA, индуцированный EA, в плазме крови человека

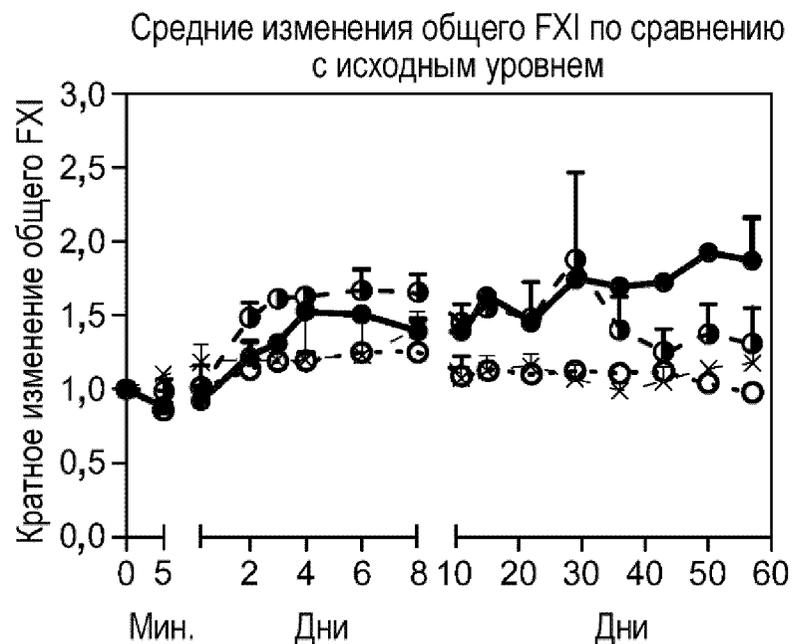


Фиг. 9D

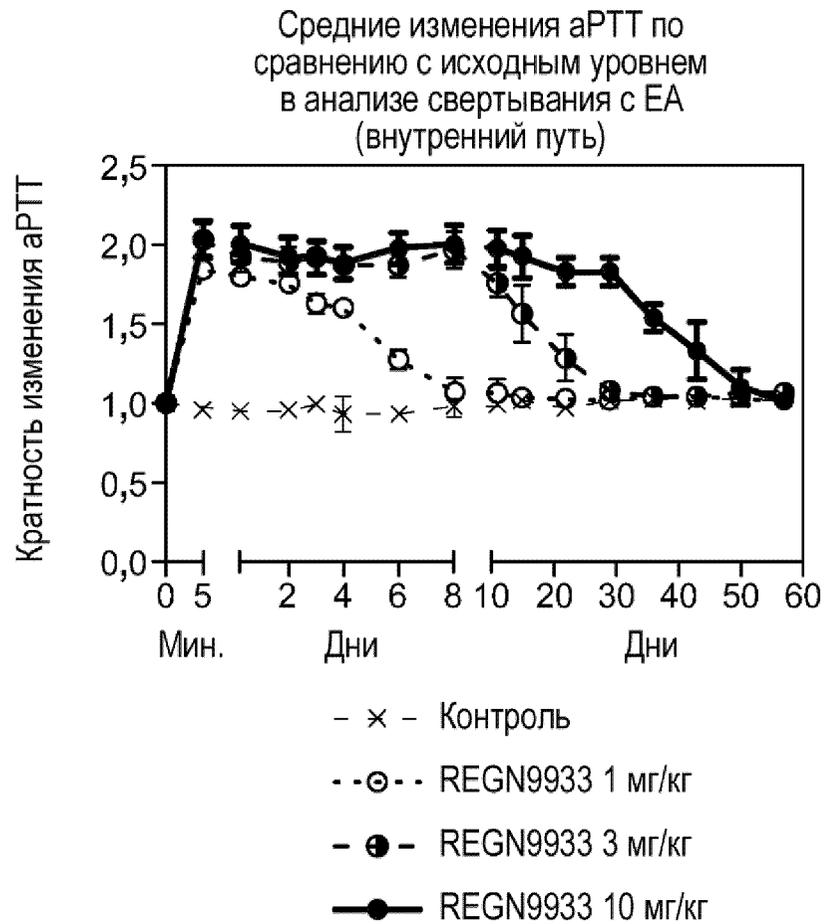


- × - Контроль
- ○ - REGN9933 1 мг/кг
- ● - REGN9933 3 мг/кг
- ● - REGN9933 10 мг/кг

Фиг. 10А



Фиг. 10В

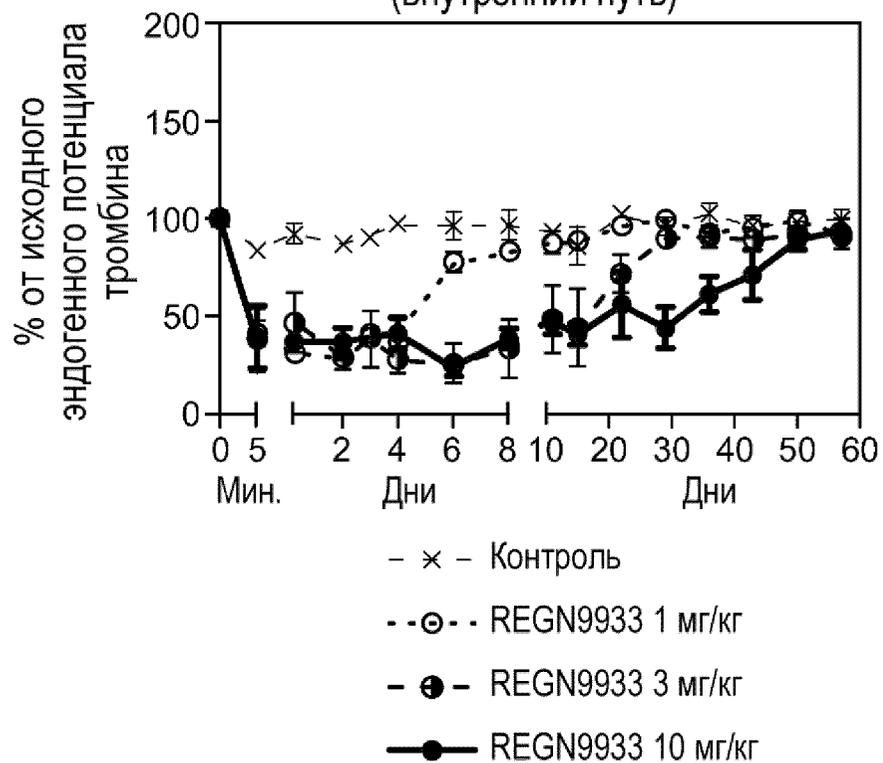


Фиг. 11А



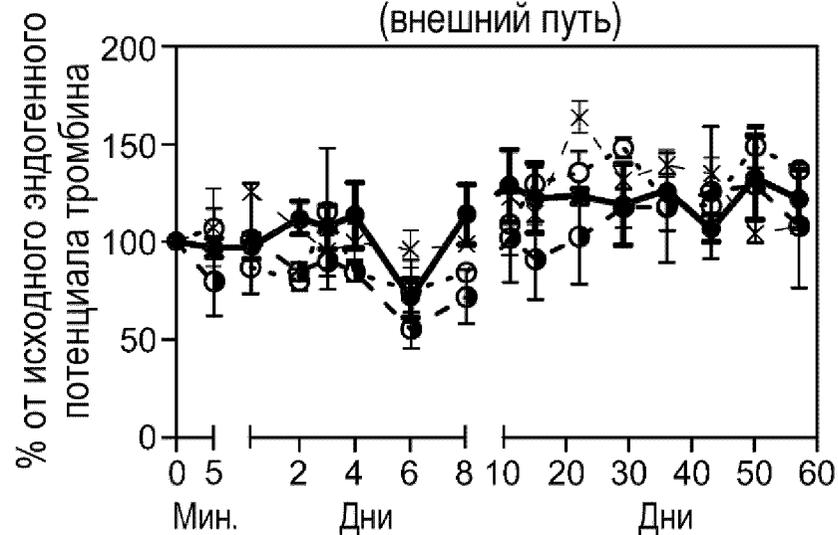
Фиг. 11В

Средние изменения эндогенного потенциала тромбина по сравнению с исходным уровнем в TGA с EA (внутренний путь)



Фиг. 12А

Средние изменения эндогенного потенциала тромбина по сравнению с исходным уровнем в TGA с TF (внешний путь)



Фиг. 12В