

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045920**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.18

(21) Номер заявки
201891388

(22) Дата подачи заявки
2016.12.09

(51) Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **ИНГИБИТОРЫ КАЛЛИКРЕИНА ПЛАЗМЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ОБОСТРЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА**

(31) **62/266,192; 62/266,175; 62/395,833**

(32) **2015.12.11; 2015.12.11; 2016.09.16**

(33) **US**

(43) **2018.11.30**

(86) **PCT/US2016/065980**

(87) **WO 2017/100679 2017.06.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(56) **WO-A2-2014152232
WO-A1-2016160926**

**CHYUNG YUNG ET AL.: "A phase 1 study
investigating DX-2930 in healthy subjects", ANNALS
OF ALLERGY, ASTHMA & IMMUNOLOGY,
ARLINGTON HEIGHTS, IL, US, vol. 113,
no. 4, 26 June 2014 (2014-06-26), page 460,
XP029068455, ISSN: 1081-1206, DOI: 10.1016/
J.ANAI.2014.05.028, page 460 - page 466
WO-A1-2015112578**

(72) Изобретатель:
**Шранц Дженнифер, Эйделман Берт,
Чиунг Юнг (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены антитела калликреина плазмы, связывающиеся с активным калликреином плазмы, и способы применения таких антител в лечении и профилактике обострения наследственного ангионевротического отека; такой способ может включать первый период лечения и необязательно второй период лечения. Также представлены способы применения таких антител в лечении наследственного ангионевротического отека, включающие введение разовой дозы антитела субъекту, перенесшему предшествующее лечение НАЕ, с последующими многократными дозами того же антитела, если субъект испытывает обострение НАЕ после разовой дозы.

B1

045920

045920

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет даты подачи предварительной заявки на патент США № 62/266175, поданной 11 декабря 2015, предварительной заявки на патент США № 62/266192, поданной 11 декабря 2015 и предварительной заявки на патент США № 62/395833, поданной 16 сентября 2016. Полное содержание каждой из этих ссылочных заявок включено посредством ссылки в настоящую заявку.

Предпосылки создания изобретения

Калликреин плазмы представляет собой сериновый протеазный компонент контактной системы и потенциальную мишень для лекарственных средств от различных воспалительных, сердечнососудистых, инфекционных (сепсис) и онкологических заболеваний (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). Контактная система активируется либо фактором XIIa при воздействии чужеродных или отрицательно заряженных поверхностей, либо на поверхности эндотелиальных клеток посредством пролилкарбоксипептидаз (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). Активация калликреина плазмы усиливает внутреннюю коагуляцию посредством активации по типу обратной связи фактора XII и усиливает воспаление посредством продуцирования провоспалительного нонапептида брадикинина. В качестве первичной кининогеназы в циркуляции калликреин плазмы в значительной степени ответственен за выработку брадикинина в сосудистой системе. Генетический дефицит белка C1-ингибитора (C1-INH), основного природного ингибитора калликреина плазмы, приводит к наследственному ангионевротическому отеку (НАЕ). Пациенты с НАЕ страдают от острых приступов болезненного отека, часто вызываемого неизвестными триггерами (Zuraw B.L. et al., *N Engl J Med* 359, 1027-1036, 2008).

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлены схемы для лечения обострения наследственного ангионевротического отека (НАЕ), снижения частоты приступов НАЕ или блокирования обострения НАЕ с использованием антител, способных к связыванию и ингибированию калликреина плазмы человека (pKal) в активной форме, например, антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и DX-2930 (a.k.a. SHP643), или конкурируют с DX-2930 за связывание с активным pKal человека.

В некоторых аспектах, настоящее раскрытие обеспечивает способы для лечения обострения наследственного ангионевротического отека (НАЕ) или снижения частоты приступов НАЕ, включающие введение (например, подкожно) нуждающемуся в этом субъекту любого из анти-pKal антител, описанных в настоящем изобретении (например, DX-2930), в разовых и/или многократных дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят субъекту (например, пациенту-человеку) в многократных дозах в первый период лечения, например, 26 недель. Например, антитело можно вводить при около 300 мг каждые две недели, около 300 мг каждые четыре недели или около 150 мг каждые четыре недели в первый период лечения.

Любой из способов, описанных в настоящем изобретении, может дополнительно включать введение субъекту антитела для второго периода лечения (например, 26 недель) после первого периода лечения. В некоторых вариантах осуществления первую дозу второго периода лечения вводят примерно через две недели после последней дозы первого периода лечения. В некоторых вариантах осуществления второй период лечения включает многократные дозы антитела около 300 мг каждые две недели в течение, например, 26 недель.

Альтернативно, способы могут дополнительно включать введение субъекту разовой дозы антитела (например, около 300 мг) после первого периода лечения. После разовой дозы можно вводить одну или более доз антитела (например, около 300 мг каждые 2 недели), если после разовой дозы случается обострение НАЕ. Первую дозу последующего лечения можно вводить в течение одной недели после обострения НАЕ. В некоторых вариантах осуществления между введением разовой дозы и первой дозы последующего лечения делают перерыв по меньшей мере 10 дней.

Другие аспекты настоящего раскрытия обеспечивают способы для лечения обострения наследственного ангионевротического отека (НАЕ) или снижения частоты приступов НАЕ у субъекта, который ранее принимал лечение от НАЕ, включающие (i) введение (например, подкожно) нуждающемуся в этом субъекту любого из анти-pKal антител, описанных в настоящем изобретении (например, DX-2930), антитело в разовой дозе около 300 мг; и (ii) дальнейшее введение субъекту антитела в многократных дозах около 300 мг каждые две недели, если субъект испытывает приступ НАЕ после (i). Субъект мог подвергаться первому лечению НАЕ, как описано в настоящем изобретении. Например, первое лечение НАЕ может представлять собой лечение, включающее то же антитело (например, DX-2930). В некоторых примерах первое лечение НАЕ включает введение антитела в многократных дозах около 150 мг или 300 мг каждые четыре недели или введение антитела в многократных дозах около 300 мг каждые две недели. Альтернативно или в дополнение, первая доза из многократных доз дается субъекту в течение одной недели после обострения НАЕ.

В любом из способов лечения, описанных в настоящем изобретении, субъект может представлять собой пациента-человека, имеющего НАЕ или с повышенным риском НАЕ. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека, имеющего НАЕ I типа или II типа. Например, субъект может иметь по меньшей мере одно обострение НАЕ за четыре недели до первой дозы первого периода лечения или по меньшей мере два обострения НАЕ за восемь недель до первой дозы перво-

го периода лечения. В других примерах субъектом может быть пациент-человек, который испытал по меньшей мере два обострения НАЕ в год до лечения. Альтернативно или в дополнение, субъект представляет собой пациента-человека, у которого не было предшествующего лечения, например, по меньшей мере за две недели до первой дозы первого периода лечения.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению любым из способов, описанных в настоящем изобретении, которые включают использование любого из анти-rKa1 антител, также описанных в настоящем изобретении (например, DX-2930), принимал одно или более лечений НАЕ перед первой дозой анти-rKa1 антитела. Такие предшествующие лечения НАЕ могут включать C1-ингибитор (например, C1-INH), ингибитор калликреина плазмы (например, экаллантин), антагонист рецептора брадикинина (например, икатибант), аттенуированный андроген (например, даназол), антифибринолитическое средство (например, транексамовая кислота) или их комбинации. У такого субъекта мог быть период постепенного перехода от предшествующего лечения НАЕ до лечения анти-rKa1 антителом, описанным в настоящем изобретении. В некоторых примерах период снижения дозировки может составлять от 2 до 4 недель. Предшествующее лечение НАЕ может заканчиваться либо перед первой дозой анти-rKa1 антитела, либо в течение трех недель после введения субъекту первой дозы анти-rKa1 антитела. Альтернативно, субъект может быть непосредственно переведен с любого предшествующего лечения НАЕ на лечение анти-rKa1 антителом, как описано в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления субъект не имеет долгосрочной профилактики НАЕ или лечения НАЕ, включающего ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), эстрогенсодержащий препарат или андроген, до первого периода лечения, во время первого периода лечения и/или во время второго периода лечения.

Анти-rKa1 антитело для применения в схемах лечения, описанных в настоящем изобретении, может быть полноразмерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело может включать те же CDR, что и DX-2930. В одном примере антитело представляет собой DX-2930.

В любом из способов, описанных в настоящем изобретении, антитело может быть сформулировано в фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает фосфат натрия, лимонную кислоту, гистидин, хлорид натрия и Tween 80. В одном примере фосфат натрия присутствует в концентрации около 30 мМ, лимонная кислота присутствует в концентрации около 19 мМ, гистидин присутствует в концентрации около 50 мМ, хлорид натрия присутствует в концентрации около 90 мМ и/или полисорбат 80 составляет около 0,01%.

Детали одного или более вариантов осуществления изобретения изложены ниже в описании. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующих чертежей и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание чертежей:

Фиг. 1 показывает примерный режим дозирования, включающий первый период лечения, в котором пациентам вводят DX-2930 при дозе 300 мг каждые две недели, 300 мг каждые четыре недели или 150 мг каждые 4 недели.

Фиг. 2 показывает примерный режим дозирования, включающий второй период лечения после первого периода лечения. Во втором периоде лечения пациентам вводят разовую дозу DX-2930 300 мг. Если пациент испытывает обострения НАЕ, антитело впоследствии вводят при дозе 300 мг каждые две недели.

Фиг. 3 показывает 2-цепочечный высокомолекулярный кининоген (НМВК) в образцах плазмы НАЕ пациентов, получавших DX-2930 в указанные дни в указанных дозах (30 мг, 100 мг, 300 мг или 400 мг), как обнаружено при помощи Вестерн-блот-анализа. Базовый уровень 2-цепочечного НМВК, обнаруженный у здоровых субъектов, указывается пунктирной линией. Для каждого дня колонки соответствуют, слева направо, плацебо, 30 мг, 100 мг, 300 мг и 400 мг.

Подробное описание Определения

Для удобства перед последующим описанием настоящего изобретения определены некоторые термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Другие термины определяются по мере того, как они встречаются в описании.

Формы единственного числа "a", "an", и "the" включают множественное число, если контекст явно не диктует иное.

В контексте настоящего изобретения термин "около" относится к определенному значению $\pm 5\%$. Например, антитело около 300 мг включает любое количество антитела между 285 мг-315 мг.

Термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, способной специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., через, по меньшей мере, один сайт распознавания антигена, расположенный в вариательной области молекулы иммуноглобулина. Антитело может включать по меньшей мере одну тяжелую (H) цепь, которая включает вариательный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), по меньшей мере одну легкую цепь, которая включает вариательный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L), или обе. Например, антитело может включать вариатель-

ную область тяжелой (H) цепи (сокращенно указана в настоящем изобретении как V_H или HV) и переменную область легкой (L) цепи (сокращенно указана в настоящем изобретении как V_L или LV). В другом примере антитело включает две переменные области тяжелой (H) цепи и две переменные области легкой цепи (L).

В контексте настоящего изобретения термин "антитело" охватывает не только интактные (т.е. полноразмерные) поликлональные или моноклональные антитела, но также их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) доменные (dAb) фрагменты антитела (de Wildt et al., Euro. J. Immunol. (1996) 26(3): 629-639), любые их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена требуемой специфичности, включая варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотных последовательностей антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитело включает антитело любого класса, такое как IgD, IgE, IgG, IgA или IgM (или их подкласс), и антитело необязательно должно быть какого-либо определенного класса. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей антител, иммуноглобулины могут быть причислены к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Антитела могут быть из любого источника, но предпочтительны приматы (человек и отличные от человека приматы) и приматизированные антитела.

Области V_H и/или V_L могут включать всю или часть аминокислотной последовательности встречающегося в природе переменного домена. Например, последовательность может не включать одну, две или более N- или C-концевых аминокислоты, внутренних аминокислот, может включать одну или более вставок или дополнительных концевых аминокислот или может включать другие изменения. В одном варианте осуществления полипептид, который включает последовательность переменного домена иммуноглобулина, может связываться с другой последовательностью переменного домена иммуноглобулина с образованием антигенсвязывающего сайта, например, структуры, которая преимущественно взаимодействует с калликреином плазмы.

Области V_H и/или V_L можно далее подразделить на области гипервариабельности, называемые "определяющими комплементарность областями" ("CDRs"), чередующиеся с областями, которые более консервативны, называемыми "каркасными областями" ("FRs"). Размеры каркасной области и CDR были определены (см., Rabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, и Chothia, C et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). Определения Кэбата используются в настоящем изобретении. Каждый VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В дополнение к V_H или V_L областям, тяжелая цепь или легкая цепь антитела может включать всю или часть константной области тяжелой или легкой цепи. В одном варианте осуществления антитело представляет собой тетрамер из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина, где тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина связаны между собой, например, дисульфидными связями. В IgGs константная область тяжелой цепи включает три домена иммуноглобулина, CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи включает CL домен. Переменная область тяжелой и легкой цепей содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Легкие цепи иммуноглобулина могут быть каппа- или лямбда- типа. В одном варианте осуществления антитело является гликозилированным. Антитело может быть функциональным для антитело-зависимой цитотоксичности и/или комплемент-опосредованной цитотоксичности.

Одна или более областей антитела могут быть человеческими или, по существу, человеческими. Например, одна или более переменных областей могут быть человеческими или по существу человеческими. Например, одна или более из CDR могут быть человеческими, например, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 и/или LC CDR3. Каждая из CDRs легкой цепи (LC) и/или тяжелой цепи (HC) могут быть человеческими. HC CDR3 может быть человеческой. Одна или более каркасных областей могут быть человеческими, например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4 в HC и/или LC. Например, Fc область может быть человеческой. В одном варианте осуществления все каркасные области являются человеческими, например, происходящими из соматической клетки человека, например гемopoэтической клетки, которая продуцирует иммуноглобулины, или негемopoэтической клетки. В одном варианте осуществления человеческие последовательности представляют собой последовательности зародышевой линии, например, кодируемые нуклеиновой кислотой зародышевой линии. В одном варианте осуществ-

ления каркасные (FR) остатки выбранной Fab могут быть преобразованы в аминокислотный тип соответствующего остатка в наиболее родственном гене зародышевой линии приматов, особенно в гене зародышевой линии человека. Одна или более константных областей могут быть человеческими или по существу человеческими. Например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 или 100% варибельного домена иммуноглобулина, константная область, константные домены (CH1, CH2, CH3 и/или CL1) или антитело в целом могут быть человеческими или по существу человеческими.

Антитело может кодироваться геном иммуноглобулина или его сегментом. Иллюстративные гены иммуноглобулина человека включают гены каппа, лямбда, альфа (IgA1 и IgA2), гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эpsilon и мю константной области, а также многие гены варибельной области иммуноглобулина. Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулина (около 25 КДа или около 214 аминокислот) кодируются геном варибельной области на NH2-конце (около 110 аминокислот) и геном каппа или лямбда константной области на COOH-конце. Полноразмерные "тяжелые цепи" иммуноглобулина (около 50 КДа или около 446 аминокислот), аналогичным образом кодируются геном варибельной области (около 116 аминокислот) и одним из других вышеуказанных генов константной области, например, гамма (кодирующей около 330 аминокислот). Длина человеческой HC значительно варьируется, поскольку HC CDR3 варьируется от примерно 3 аминокислотных остатков до более 35 аминокислотных остатков.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" полноразмерного антитела относится к одному или более фрагментам полноразмерного антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с представляющей интерес мишенью. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий фрагмент" полноразмерного антитела и которые сохраняют функциональность, включают (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и $CH1$; (ii) $F(ab')_2$ фрагмент, двухвалентный фрагмент, включающий два Fab фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из доменов V_H и $CH1$; (iv) Fv фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из V_H домена; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv фрагмента, V_L и V_H , кодируются разными генами, они могут быть объединены с использованием рекомбинатных методов синтетическим линкером, что обеспечивает возможность их получения в виде отдельной белковой цепи, в которой области V_L и V_H спариваются с образованием моновалентных молекул, известных как одноцепочечные Fv (scFv). См., например, патенты США №№ 5260203, 4946778, и 4881175; Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. Фрагменты антител могут быть получены с использованием любого подходящего метода, включая обычные методы, известные специалистам в данной области.

Термин "моноспецифическое антитело" относится к антителу, которое проявляет одну специфичность связывания и сродство к конкретной мишени, например, эпитопу. Этот термин включает "моноклональное антитело" или "композицию моноклонального антитела", которые, в контексте настоящего изобретения, относятся к препарату антител или их фрагментов с одной молекулярной композицией, независимо от того, как было образовано антитело. Антитела являются "модифицированными на уровне генов зародышевой линии" путем возврата одной или более аминокислот не относящихся к зародышевой линии в каркасных областях в соответствующие аминокислоты антитела эмбрионального типа, при условии, что связывающие свойства по существу сохраняются.

Константа ингибирования (K_i) является показателем ингибиторной активности; она представляет собой концентрацию ингибитора, необходимую для снижения ферментативной активности наполовину, и не зависит от концентраций фермента или субстрата. Кажущуюся K_i ($K_{i,app}$) получают при разных концентрациях субстрата путем измерения ингибиторного эффекта различных концентраций ингибитора (например, ингибирующего связывающего белка) на степень реакции (например, ферментативную активность); подгонка изменения значения константы псевдопервого порядка в зависимости от концентрации ингибитора к уравнению Моррисона (уравнение 1) получают значение кажущейся K_i . Значение K_i получают из отрезка, отсекаемого на оси Y, полученного из линейного регрессионного анализа графика зависимости $K_{i,app}$ от концентрации субстрата.

$$v = v_o - v_o \left(\frac{(K_{i,app} + I + E) - \sqrt{(K_{i,app} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right)$$

Уравнение 1

Где v =измеренная скорость; v_0 =скорость в отсутствие ингибитора; $K_{i,app}$ =кажущаяся константа ингибирования; I =общая концентрация ингибитора; и E =общая концентрация фермента.

В контексте настоящего изобретения термин "аффинность связывания" относится к кажущейся константе ассоциации или K_A . K_A является обратной величиной константы диссоциации (K_D). Связывающее антитело, например, может иметь аффинность связывания по меньшей мере 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ и 10¹¹ M⁻¹ для конкретной молекулы-мишени, например, калликреина плазмы. Более высокая аффинность связывания связывающего антитела с первой мишенью по сравнению со второй мишенью может быть указана более высоким значением K_A (или меньшим численным значением K_D) для связыва-

ния первой мишени, чем значение K_A (или численное значение K_D) для связывания второй мишени. В таких случаях, связывающее антитело имеет специфичность в отношении первой мишени (например, белок в первой конформации или его имитатор) по сравнению со второй мишенью (например, тот же белок во второй конформации или его имитатор; или второй белок). Различия в аффинности связывания (например, для специфичности или других сравнений) могут быть по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90, 100, 500, 1000, 10,000 или 10^5 раз.

Аффинность связывания может быть определена различными способами, включая равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с использованием флуоресцентного анализа). Иллюстративные условия для оценки аффинности связывания включают использование буфера HBS-P (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% (об/об) поверхностно-активное вещество P20). Эти методы могут быть использованы для измерения концентрации связанного и свободного связывающего белка в зависимости от концентрации белка (или мишени). Концентрация связанного связывающего белка ([Связанный]) связана с концентрацией свободного связывающего белка ([Свободный]) и концентрацией сайтов связывания для связывающего белка на мишени, где (N) означает количество сайтов связывания на молекулу-мишень, посредством следующего уравнения:

$$[\text{Связанный}] = N [\text{Свободный}] / ((1/K_A) + [\text{Свободный}]).$$

Не всегда необходимо точное определение K_A , хотя, поскольку иногда этого достаточно для получения количественного измерения аффинности, например, определенной с использованием метода, такого как ELISA или анализ FACS, пропорционально K_A и, следовательно, может быть использовано для сравнений, таких как определение того, является ли более высоким средством, например, в 2 раза выше, для получения качественного измерения сродства или для логического вывода сродства, например, по активности в функциональном анализе, например, *in vitro* или *in vivo* анализе.

Термин "связывающее антитело" (или "связывающий белок", используемые взаимозаменяемо в настоящем изобретении) относится к антителу, которое может взаимодействовать с молекулой-мишенью. Этот термин используется взаимозаменяемо с "лигандом". "Связывающееся с калликреином плазмы антитело" относится к антителу, которое может взаимодействовать с (например, связываться) калликреином плазмы, и включает, в частности, антитела, которые преимущественно или специфически взаимодействуют с калликреином плазмы и/или ингибируют его. Антитело ингибирует калликреин плазмы, если оно вызывает снижение активности калликреина плазмы по сравнению с активностью калликреина плазмы в отсутствие антитела и в тех же условиях.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, известны из уровня техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Возможно, что один или более аминокислотных остатков каркасной области и/или CDR связывающего белка могут включать одну или более мутаций (например, замен (например, консервативных замен или замен не относящихся к незаменимым аминокислот), инсерций или делеций) относительно связывающего белка, описанного в настоящем изобретении. Белок, связывающий калликреин плазмы, может иметь мутации (например, замены (например, консервативные замены или замены не относящихся к незаменимым аминокислот), инсерций или делеций) (например, по меньшей мере одну, две, три или четыре и/или меньше чем 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 мутаций) относительно связывающего белка, описанного в настоящем изобретении, например, мутации, не влияющие существенным образом на функцию белка. Мутации могут присутствовать в каркасных областях, CDR и/или константных областях. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в каркасной области. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в константной области. Является ли переносимой конкретная замена или нет, т.е. будет ли иметь место неблагоприятный эффект в отношении биологических свойств, таких как связывающая активность, можно прогнозировать, например, путем оценки того, является ли мутация консервативной, или при помощи способа Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310,

"По существу человеческая" варибельная область иммуноглобулина является варибельной областью иммуноглобулина, включающей достаточное количество положений аминокислот человека, так что варибельная область иммуноглобулина не вызывает иммуногенный ответ у нормального человека. "По существу человеческое" антитело является антителом, включающим достаточное количество положений аминокислот человека, так что антитело не вызывает иммуногенный ответ у нормального человека.

"Эпитоп" относится к сайту на соединении-мишени, которое связывается связывающим белком (например, антителом, таким как Fab или полноразмерное антитело). В случае, если соединение-мишень

является белком, сайт может полностью состоять из аминокислотных компонентов, полностью состоять из химических модификаций аминокислот белка (например, гликозильных фрагментов) или состоять из их комбинаций. Перекрывающиеся эпитопы включают по меньшей мере один общий аминокислотный остаток, гликозильную группу, фосфатную группу, сульфатную группу или другой молекулярный признак.

Первое связывающее антитело "связывается с тем же эпитопом", что и второе связывающее антитело, если первое связывающее антитело связывается с тем же сайтом на соединении-мишени, с которым связывается второе связывающее антитело, или связывается с сайтом, перекрывающимся (например, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% перекрывающимся, например, что касается аминокислотной последовательности или другого молекулярного признака (например, гликозильной группы, фосфатной группы или сульфатной группы)) с сайтом, с которым связывается второе связывающее антитело.

Первое связывающее антитело "конкурирует за связывание" со вторым связывающим антителом, если связывание первого связывающего антитела с его эпитопом снижает (например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более) количество второго связывающего антитела, связывающегося с его эпитопом. Конкуренция может являться прямой (например, первое связывающее антитело связывается с эпитопом, который является тем же, что и эпитоп, связываемый вторым связывающим антителом, или перекрывается с ним), или опосредованной (например, связывание первого связывающего антитела с его эпитопом вызывает стерическое изменение в соединении-мишени, которое снижает способность второго связывающего антитела связываться с его эпитопом).

Вычисления "гомологии" или "идентичности последовательности" между двумя последовательностями (эти термины в настоящем описании используются взаимозаменяемо) осуществляют следующим образом. Последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например, можно включать гэпы в одну или обе из первой и второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности для оптимального выравнивания, и в целях сравнения можно не учитывать негомологичные последовательности). Оптимальное выравнивание определяют как наилучшую оценку с использованием программы GAP в пакете программ GCG с матрицей замен Blossum 62, со штрафом за один гэп 12, штрафом за увеличение гэпа 4 и штрафом за гэп со сдвигом рамки считывания 5. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении (в контексте настоящего изобретения "идентичность" аминокислот или нуклеиновых кислот эквивалентна "гомологии" аминокислот или нуклеиновых кислот). Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей.

В предпочтительном варианте осуществления длина референсной последовательности, выравниваемой в целях сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, даже более предпочтительно по меньшей мере 60%, и еще более предпочтительно по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 100% длины референсной последовательности. Например, референсная последовательность может иметь длину последовательности варибельного домена иммуноглобулина.

"Гуманизованная" варибельная область иммуноглобулина является варибельной областью иммуноглобулина, модифицированной так, чтобы она включала достаточное количество положений аминокислот человеческой каркасной области, таким образом, чтобы варибельная область иммуноглобулина не вызывала иммунный ответ у нормального человека. Описания "гуманизованных" иммуноглобулинов включают, например, патенты США №№ 6407213 и 5693762.

"Выделенное" антитело относится к антителу, выделенному из по меньшей мере 90% по меньшей мере одного компонента природного образца, из которого можно получать выделенное антитело. Антитела могут иметь "по меньшей мере" определенную степень чистоты, если вид или популяция представляющих интерес видов имеет чистоту по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 или 99% по массе.

"Пациент", "субъект" или "хозяин" (эти термины используются взаимозаменяемо), подлежащий лечению способом по настоящему изобретению, может означать человека или не являющегося человеком животного. Субъект может быть субъектом, который подвергся ранее лечению НАЕ, такому, как лечение, включающее антитело, описанное в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, субъект является педиатрическим субъектом (например, младенец, ребенок или подросток).

Термины "прекалликреин" и "прекалликреин плазмы" используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении, и они относятся к зимогенной форме активного калликреина плазмы, также известной как прекалликреин.

В контексте настоящего изобретения термин "по существу идентичный" (или "по существу гомологичный") используют для обозначения первой аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности, содержащей достаточное количество идентичных или эквивалентных (например, со схожей боковой цепью, например, консервативными аминокислотными заменами) аминокислотных остатков или нуклеотидов со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью, таким образом, первая и вторая аминокислотные или нуклеиновокислотные последовательности имеют (или ко-

дируют белки, имеющие) схожие активности, например, связывающую активность, предпочтительность связывания или биологическую активность. В случае антител, второе антитело имеет ту же специфичность и имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 25% или по меньшей мере 10% аффинности относительно того же антигена.

Последовательности, схожие или гомологичные (например, по меньшей мере около 85% идентичности последовательностей) последовательностям, раскрытым в настоящем изобретении, также являются частью настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять около 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, может иметь идентичность последовательности около 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с антителом, описанным в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, может иметь идентичность последовательности около 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более в каркасных областях HC и/или LC (например, FR 1, 2, 3 и/или 4 HC и/или LC) с антителом, описанным в настоящем изобретении (например, DX-2930). В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, может иметь идентичность последовательности около 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более в константной области (например, CH1, CH2, CH3 и/или CL1) с антителом, описанным в настоящем изобретении (например, DX-2930).

Кроме того, существует значительная идентичность, когда нуклеиновокислотные сегменты гибридизуются в селективных условиях гибридизации (например, очень жестких условиях гибридизации) с комплементом цепи. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в лизате клеток или в частично очищенной или, по существу, чистой форме.

Статистическую значимость можно определить любым способом, известным в этой области. Примеры статистических тестов включают: t-критерий Стьюдента, непараметрический U-критерий Манна-Уитни и непараметрический критерий Вилкоксона. Некоторые статистические значимые взаимосвязности имеют значение P менее 0,05 или 0,02. Конкретные связывающие белки могут демонстрировать разницу, например, в специфичности или связывании, являющуюся статистически значимой (например, значение $P < 0,05$ или 0,02). Термины "индуцировать", "ингибировать", "потенцировать", "повышать", "увеличивать", "снижать" или т.п., например, обозначающие заметные качественные или количественные различия между двумя состояниями, могут относиться к различиям, например, статистически значимым различиям между двумя состояниями.

"Терапевтически эффективная доза" предпочтительно модулирует измеримый параметр, например, активность калликреина плазмы, в статистически значимой степени или по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% относительно субъектов, не подвергаемых лечению. Способность соединения модулировать измеримый параметр, например, ассоциированный с заболеванием параметр, можно оценивать в системе животной модели, прогностической в отношении эффективности при расстройствах и состояниях человека. Альтернативно, это свойство композиции можно оценивать путем исследования способности соединения модулировать параметр *in vitro*.

Термин "лечение", используемый в настоящем изобретении, относится к использованию или введению композиции, включающей одно или более активных средств, субъекту, имеющему аллергическое заболевание, симптом аллергического заболевания или предрасположенность к аллергическому заболеванию, с целью выздоровления, заживления, ослабления, смягчения, изменения, излечения, улучшения, оздоровления или воздействия на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию. "Профилактическое лечение", также известное как "превентивное лечение", относится к лечению, направленному к защите индивидуума или снижению риска заболевания, которому он или она подвергается или может подвергаться. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении способы лечения направлены на предотвращение возникновения и/или рецидива НАЕ.

Термин "профилактика" заболевания у субъекта относится к фармацевтическому лечению субъекта, например, введению лекарственного средства, таким образом, чтобы предотвратить по меньшей мере один симптом заболевания, т.е. введение осуществляют до клинического проявления нежелательного состояния (например, заболевания или другого нежелательного состояния животного-хозяина), чтобы защитить хозяина от развития нежелательного состояния. "Предотвращение" заболевания также можно назвать "профилактикой" или "профилактическим лечением".

"Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному, при необходимых дозах и в течение необходимого периода времени, для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, поскольку профилактическую дозу используют для субъектов до развития заболевания или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество будет меньше, чем тера-

пептически эффективное количество.

Антитела, связывающие калликреин плазмы (pKal)

Антитела, связывающие калликреин плазмы (анти-pKal антитела), для применения в способах, представленных в настоящем изобретении, могут быть полноразмерными (например, IgG (включая IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (включая, IgA1, IgA2), IgD и IgE) или могут включать только антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab, F(ab')₂ или scFv-фрагмент). Связывающее антитело может включать две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина или может являться одноцепочечным антителом. Антитела, связывающие калликреин плазмы, могут представлять собой рекомбинантные белки, такие как гуманизированные, CDR-привитые, химерные, деиммунизированные или *in vitro* образованные антитела, и необязательно могут включать константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В одном из вариантов осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, является моноклональным антителом.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу (например, выделенному антителу), связывающемуся с калликреином плазмы (например, калликреином плазмы человека и/или калликреином мыши), и включает по меньшей мере одну вариабельную область иммуноглобулина. Например, антитело включает последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (HC) иммуноглобулина и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи (LC) иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления антитело связывается и ингибирует калликреин плазмы, например, калликреин плазмы человека и/или мышинный калликреин.

Антитело может включать одну или более из следующих характеристик: (a) человеческую CDR или человеческую каркасную область; (b) последовательность вариабельного домена HC иммуноглобулина включает одну или более (например, 1, 2 или 3) CDR, являющихся по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичными CDR вариабельного домена HC, описанной в настоящем изобретении; (c) последовательность вариабельного домена LC иммуноглобулина включает одну или более (например, 1, 2 или 3) CDR, являющихся по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичными CDR вариабельного домена LC, описанной в настоящем изобретении; (d) последовательность вариабельного домена LC иммуноглобулина является по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной вариабельному домену LC, описанному в настоящем изобретении (например, в целом или в каркасных областях или CDR); (e) последовательность вариабельного домена HC иммуноглобулина является по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной вариабельному домену HC, описанному в настоящем изобретении (например, в целом или в каркасных областях или CDR); (f) антитело связывается с эпитопом, связываемым антителом, описанным в настоящем изобретении, или конкурирует за связывание с антителом, описанным в настоящем изобретении; (g) CDR примата или каркасная область примата; (h) последовательность вариабельного домена HC иммуноглобулина включает CDR1, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2 или 3 аминокислотами от CDR1 вариабельного домена HC, описанной в настоящем изобретении; (i) последовательность вариабельного домена HC иммуноглобулина включает CDR2, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотами от CDR2 вариабельного домена HC, описанной в настоящем изобретении; (j) последовательность вариабельного домена HC иммуноглобулина включает CDR3, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотами от CDR3 вариабельного домена HC, описанной в настоящем изобретении; (k) последовательность вариабельного домена LC иммуноглобулина включает CDR1, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от CDR1 вариабельного домена LC, описанной в настоящем изобретении; (l) последовательность вариабельного домена LC иммуноглобулина включает CDR2, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2, 3 или 4 аминокислотами от CDR2 вариабельного домена LC, описанной в настоящем изобретении; (m) последовательность вариабельного домена LC иммуноглобулина включает CDR3, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от CDR3 вариабельного домена LC, описанной в настоящем изобретении; (n) последовательность вариабельного домена LC иммуноглобулина отличается по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами от вариабельного домена LC, описанного в настоящем изобретении (например, в целом или в каркасных областях или CDR); и (o) последовательность вариабельного домена HC иммуноглобулина отличается по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами от вариабельного домена HC, описанного в настоящем изобретении (например, в целом или в каркасных областях или CDR).

Белок, связывающий калликреин плазмы, может представлять собой выделенное антитело (например, по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 99% свободное от других белков). В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, или его композиция выделены из фрагментов расщепления антитела (например, DX-2930), являющихся неактивными или частично активными (например, связывают калликреин плазмы с $K_{i,app}$ 5000 нМ или более) по сравнению с антителом, связывающим калликреин плазмы. Например, антитело, связывающее калликреин плазмы, по меньшей мере

на 70% свободно от таких фрагментов расщепления антитела; в других вариантах осуществления связывающее антитело по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или даже на 100% свободно от фрагментов расщепления антитела, являющихся неактивными или частично активными.

Антитело, связывающее калликреин плазмы, дополнительно может ингибировать калликреин плазмы, например, калликреин плазмы человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, не связывается с прекалликреином (например, человеческим прекалликреином и/или мышинным прекалликреином), но связывается с активной формой калликреина плазмы (например, человеческим плазменным калликреином и/или мышинным калликреином).

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается на активном сайте или вблизи активного сайта каталитического домена калликреина плазмы или его фрагмента, или связывается с эпитопом, перекрывающимся с активным сайтом калликреина плазмы.

В некоторых аспектах антитело связывается с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с антителом, описанным в настоящем изобретении.

Антитело может связываться с калликреином плазмы, например, калликреином плазмы человека, с аффинностью связывания по меньшей мере 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} и 10^{11} M^{-1} . В одном варианте осуществления, антитело связывается с калликреином плазмы человека с K_{off} медленнее чем 1×10^{-3} , 5×10^{-4} $сек^{-1}$ или 1×10^{-4} $сек^{-1}$. В одном варианте осуществления антитело связывается с калликреином плазмы человека с K_{on} быстрее чем 1×10^2 , 1×10^3 или 5×10^3 $M^{-1}сек^{-1}$. В одном варианте осуществления антитело связывается с калликреином плазмы, но не связывается с тканевым калликреином и/или прекалликреином плазмы (например, антитело связывается с тканевым калликреином и/или прекалликреином плазмы менее эффективно (например, в 5, 10, 50, 100 или 1000 раз меньше или вообще не связывается, например, по сравнению с отрицательным контролем), чем оно связывается с калликреином плазмы).

В одном варианте осуществления антитело ингибирует активность калликреина плазмы человека, например, с K_i меньше чем 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-10} M . Антитело может иметь, например, IC_{50} меньше чем 100 нМ, 10 нМ, 1, 0,5 или 0,2 нМ. Например, антитело может модулировать активность калликреина плазмы, а также продукцию фактора XIIa (например, из фактора XII) и/или брадикинина (например, из высокомолекулярного кининогена (HMWK)). Антитело может ингибировать активность калликреина плазмы и/или продукцию фактора XIIa (например, из фактора XII) и/или брадикинина (например, из высокомолекулярного кининогена (HMWK)). Аффинность антитела к калликреину плазмы человека может характеризоваться K_D меньше чем 100 нМ, меньше чем 10 нМ, меньше чем 5 нМ, меньше чем 1 нМ, меньше чем 0,5 нМ. В одном из вариантов осуществления антитело ингибирует калликреин плазмы, но не ингибирует тканевый калликреин (например, антитело ингибирует тканевый калликреин менее эффективно (например, в 5, 10, 50, 100 или 1000 раз меньше или совсем не ингибирует, например, по сравнению с отрицательным контролем), чем оно ингибирует калликреин плазмы).

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет кажущуюся константу ингибирования ($K_{i,app}$) меньше чем 1000, 500, 100, 5, 1, 0,5 или 0,2 нМ.

Антитела, связывающие калликреин плазмы, могут иметь последовательности варьируемых доменов HC и LC, включенные в один полипептид (например, scFv) или разные полипептиды (например, IgG или Fab).

В одном из вариантов осуществления последовательности варьируемых доменов HC и LC являются компонентами одной и той же полипептидной цепи. В другом аспекте последовательности варьируемых доменов HC и LC являются компонентами разных полипептидных цепей. Например, антитело представляет собой IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитело может представлять собой растворимый Fab. В других вариантах осуществления антитело включает Fab2', scFv, минитело, слитый белок scFv::Fc, слитый белок Fab: :HSA, слитый белок HSA: :Fab, слитый белок Fab::HSA::Fab или другую молекулу, которая включает антигенсвязывающий сайт одного из связывающих описанных белков. Области VH и VL этих Fab могут быть представлены как IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, пегилированный Fab, пегилированный scFv, пегилированный Fab2, VH: : CH1: :HSA+LC, HSA: : VH: : CH1 + LC,

LC: :HSA+VH: :CH1, HSA: : LC+VH: : CH1 или другая подходящая конструкция.

В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизованное антитело или является неиммуногенным у человека. Например, антитело включает одну или более каркасных областей человеческого антитела, например, все человеческие каркасные области, или каркасные области, по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичные человеческим каркасным областям. В одном из вариантов осуществления антитело включает человеческий Fc-домен или Fc-домен, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичный человеческому Fc-домену.

В одном из вариантов осуществления антитело является антителом примата или приматизированным антителом или является неиммуногенным у человека. Например, антитело включает одну или более каркасных областей антитела примата, например, все каркасные области примата или каркасные облас-

ти, по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичные каркасным областям примата. В одном из вариантов осуществления антитело включает Fc-домен примата или Fc-домен, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичный Fc-домену примата. Термин "примат" включает людей (*Homo sapiens*), шимпанзе (*Pan troglodytes* и *Pan paniscus* (бонобо)), горилл (*Gorilla gorilla*), гиббонов, обезьян, лемуров, мадагаскарскую руконожку (*Daubentonia madagascariensis*) и долгопятов.

В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела примата к калликреину плазмы человека характеризуется K_D меньше чем 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 нМ, например, меньше чем 10 нМ, меньше чем 1 нМ или меньше чем 0,5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело не включает последовательности от мышей или кроликов (например, не является мышинным или кроличьим антителом).

В некоторых вариантах осуществления антитело, используемое в способах, представленных в настоящем изобретении, может представлять собой DX-2930, как описано в настоящем изобретении, или его функциональный вариант, или антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и DX-2930, или конкурирует с DX-2930 за связывание с активным калликреином плазмы.

В одном из примеров функциональный вариант DX-2930 включает те же определяющие комплементарности области (CDR), что и DX-2930. В другом примере функциональные варианты DX-2930 могут содержать одну или более мутаций (например, консервативных замен) в FR V_H или V_L по сравнению с V_H и V_L DX-2930. Предпочтительно, такие мутации не встречаются в остатках, которые, как прогнозируют, взаимодействуют с одним или более CDR, которые можно определять общепринятыми способами. В других вариантах осуществления функциональные варианты, описанные в настоящем изобретении, содержат одну или более мутаций (например, 1, 2 или 3) в одной или более CDR областях DX-2930. Предпочтительно, такие функциональные варианты сохраняют те же области/остатки, отвечающие за связывание антигена, что и в родительском антителе. В других вариантах осуществления функциональный вариант DX-2930 может включать V_H цепь, которая включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности V_H DX-2930, и/или V_L цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности V_L DX-2930. Эти варианты способны связываться с активной формой калликреина плазмы и, предпочтительно, не связываются с прекалликреином.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного, как описано в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиски белков в BLAST можно осуществлять с использованием программы XBLAST, баллы=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, представляющим интерес. Если между двумя последовательностями существуют гэпы, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В некоторых вариантах осуществления антитело, используемое в способах и композициях, представленных в настоящем изобретении, может представлять собой DX-2930 антитело. Полные последовательности и последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи DX-2930 представлены ниже, при этом сигнальные последовательности отмечены курсивом. CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи DX-2930 (451 аминокислота, 49439,02 Да).

*MGWSCILFLVATATGAHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS***HYIMM***WVRQAP*

GKGLEWVS**GIYSSGGITVYADSVKGR**FTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVVYCA**YRRIGVPR**

RDEFDIWQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTCP

CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRE

EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

NVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 1)

Аминокислотная последовательность легкой цепи DX-2930 (213 аминокислот, 23419,08 Да).

*MGWSCILFLVATATGAHSDIQMTQSPSTLSASVGRVITTC***CRASQSISSWLA***WYQQKPG*

KAPKLLI**YKASTLES**GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC**QOYNTYWT**FGQGTKVEI

KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи DX-2930.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITV

YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVSS

(SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи DX-2930.

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGV

SRFSGSGSGTEFTLTISLQLPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

Таблица 1

CDRs для DX-2930

CDR	Аминокислотная последовательность
CDR1 тяжелой цепи	HYIMM (SEQ ID NO: 5)
CDR2 тяжелой цепи	GIYSSGGITVYADSVKG (SEQ ID NO: 6)
CDR3 тяжелой цепи	RRIGVPRRDEFDI (SEQ ID NO: 7)
CDR1 легкой цепи	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 8)
CDR2 легкой цепи	KASTLES (SEQ ID NO: 9)
CDR3 легкой цепи	QQYNTYWT (SEQ ID NO: 10)

Получение антитела

Антитело, описанное в настоящем изобретении (например, DX-2930), можно получать любым известным в данной области способом. См., например, Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, и Greenfield, (2013) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Последовательность, кодирующую представляющее интерес антитело, например, DX-2930, может сохраняться в векторе в клетке-хозяине, а затем клетку-хозяина можно выращивать и замораживать для последующего использования. Альтернативно, последовательность полинуклеотида можно использовать для генетической манипуляции для "гуманизации" антитела или для улучшения аффинности (созревание аффинности) или других характеристик антитела. Например, константную область можно сконструировать так, чтобы она больше напоминала человеческие константные области во избежание иммунного ответа, если антитело используют в клинических испытаниях и лечении людей. Желательной может быть генетическая манипуляция с последовательностью антитела для достижения большей аффинности к антигену-мишени и большей эффективности в ингибировании активности PKa1. Специалисту в этой области будет очевидно, что можно осуществить одно или более изменений полинуклеотидов в антителе и при этом сохранить его специфичность связывания с антигеном-мишенью.

В других вариантах осуществления полностью человеческие антитела можно получить с использованием коммерчески доступных генно-инженерных мышей для экспрессии специфических человеческих иммуноглобулиновых белков. Трансгенных животных, созданных для достижения более желательного (например, полностью человеческие антитела) или более устойчивого иммунного ответа, также можно использовать для получения гуманизированных антител или человеческих антител. Примерами такой технологии являются XenomouseTM от Amgen, Inc. (Fremont, Calif.) и HuMAb-MouseTM и TC MouseTM от Medarex, Inc. (Princeton, N.J.). Альтернативно, антитела можно получать рекомбинантно с помощью фагового дисплея или дрожжевой технологии. См., например, патенты США №№ 5565332; 5580717; 5733743 и 6265150; и Winter et al., (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455. Альтернативно, можно использовать технологию фагового дисплея (McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-553) для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из репертуара генов варибельных (V) доменов иммуноглобулина от неиммунизированных доноров.

Антигенсвязывающие фрагменты интактного антитела (полноразмерного антитела) можно получать общепринятыми способами. Например, F(ab')₂-фрагменты можно получать посредством расщепления пепсином молекулы антитела, и Fab-фрагменты можно получать, восстанавливая дисульфидные мостики F(ab')₂-фрагментов.

Генетически сконструированные антитела, такие как гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела и биспецифические антитела, можно получать с помощью, например, общепринятой рекомбинантной технологии. В одном примере легко можно выделять или синтезировать ДНК, кодирующую моноклональные антитела, специфические к антигену-мишени. ДНК можно поместить в один или более экспрессирующих векторов, с помощью которых затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, COS клетки обезьян, клетки яичника китайского хомяка (CHO) или миломные клетки, которые в ином случае не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для осуществления синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. См., например, публикацию PCT № WO87/04462. Затем ДНК можно модифицировать, например, используя кодирующую последова-

тельность для константных доменов тяжелой и легкой цепи человека вместо гомологичных мышинных последовательностей, Morrison et al., (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, или посредством ковалентного соединения с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Таким образом, можно получать генетически сконструированные антитела, такие как "химерные" или "гибридные" антитела; имеющие специфичность связывания антигена-мишени.

В данной области техники хорошо известны способы, разработанные для получения "химерных антител". См., например, Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81 USA 6851; Neuberger et al. (1984) Nature 312, 604; и Takeda et al. (1984) Nature 314:452.

В данной области техники также хорошо известны способы конструирования гуманизированных антител. См., например, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989). В одном примере переменные области V_H и V_L родительского нечеловеческого антитела подвергают трехмерному молекулярному моделированию методами, известными в данной области. Затем с использованием того же молекулярного моделирования идентифицируют каркасные аминокислотные остатки, которые, как прогнозируют, будут важны для образования правильных структур CDR. Параллельно, человеческие V_H и V_L цепи, имеющие аминокислотные последовательности, гомологичные последовательностям родительского нечеловеческого антитела, идентифицируют из любой базы данных генов антител с использованием родительских последовательностей V_H и V_L в качестве поисковых запросов. Затем выбирают акцепторные гены человеческих V_H и V_L .

CDR области в выбранных акцепторных генах человека можно заменить CDR областями из родительского нечеловеческого антитела или его функциональных вариантов. При необходимости остатки в каркасных областях родительской цепи, которые, как прогнозируют, будут важны для взаимодействия с CDR областями (см. описание выше), можно использовать для замены соответствующих остатков в человеческих акцепторных генах.

Одноцепочечное антитело можно получать с помощью рекомбинантной технологии, соединяя нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, и нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи. Предпочтительно, между двумя переменными областями встраивают гибкий линкер. Альтернативно, способы, описанные для получения одноцепочечных антител (патенты США №№ 4946778 и 4704692), можно адаптировать для получения фаговой или дрожжевой scFv библиотеки, и scFv клоны, специфические для PKa1, можно идентифицировать из библиотеки, используя рутинные процедуры. Положительные клоны можно подвергнуть дальнейшему скринингу для идентификации клонов, ингибирующих активность PKa1.

Некоторые антитела, например, Fab, можно получить в бактериальных клетках, например, клетках *E. coli* (см., например, Nadkarni, A. et al., 2007 Protein Expr Purif 52 (1):219-29). Например, если Fab кодируется последовательностями в векторе фагового дисплея, включающем супрессируемый стоп-кодон между молекулой дисплея и белком бактериофага (или его фрагментом), нуклеиновую кислоту вектора можно перенести в бактериальную клетку, которая не может супрессировать стоп-кодон. В этом случае Fab не сливается с белком III гена, а секретируется в периплазму и/или среду.

Антитела также можно получить в эукариотических клетках. В одном из вариантов осуществления антитела (например, scFv) экспрессируются в дрожжевой клетке, такой как *Pichia* (см., например, Powers et al., 2001, J. Immunol. Methods. 251:123-35; Schoonooghe S. et al., 2009 BMC Biotechnol. 9:70; Abdel-Salam, HA. et al., 2001 Appl Microbiol Biotechnol 56 (1-2):157-64; Takahashi K. et al., 2000 Biosci Biotechnol Biochem 64(10):2138-44; Edqvist, J. et al., 1991 J Biotechnol 20 (3): 291-300), *Hansenula* или *Saccharomyces*. Специалист в этой области может оптимизировать продукцию антитела в дрожжах посредством оптимизации, например, кислородных условий (см., например, Baumann K., et al. 2010 BMC Syst. Biol. 4:141), осмолярности (см., например, Dragosits, M. et al., 2010 BMC Genomics 11:207), температуры (см., например, Dragosits, M. et al., 2009 J Proteome Res. 8 (3): 1380-92), условий ферментации (см., например, Ning, D. et al. 2005 J. Biochem. и Mol. Biol. 38(3): 294-299), штамма дрожжей (см., например, Kozyr, AV et al. 2004 Mol Biol (Mosk) 38 (6): 1067-75; Horwitz, AH. et al., 1988 Proc Natl Acad Sci USA 85 (22): 8678-82; Bowdish, K. et al. 1991 J Biol Chem 266 (18) :11901-8), гиперэкспрессии белков для усиления продукции антител (см., например, Gasser, B. et al., 2006 Biotechnol. Bioeng. 94(2):353-61), уровня кислотности культуры (см., например, Kobayashi H., et al., 1997 FEMS Microbiol Lett 152 (2):235-42), концентраций субстратов и/или ионов (см., например, Ko JH. et al., 2006 Appl Biochem Biotechnol 60(1):41-8). Кроме того, дрожжевые системы можно использовать для продукции антител с увеличенным временем полужизни (см., например, Smith, BJ. et al. 2001 Bioconjug Chem 12 (5): 750-756).

В одном из предпочтительных вариантов осуществления антитела продуцируются в клетках млекопитающих. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии клонов антител или их антигенсвязывающих фрагментов включают клетки китайского хомяка (клетки CHO) (включая клетки dhfr-CHO, описанные в Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с селективным маркером DHFR, например, как описано в Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), линии лимфоцитарных клеток, например, NS0 миеломные клетки и SP2 клетки, COS клетки, HEK293T клетки (J. Immunol. Methods (2004) 289(1-2):65-80) и клетку трансгенного животного, например, транс-

генного млекопитающего. Например, клетка является эпителиальной клеткой млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления антитела, связывающие калликреин плазмы, продуцируются в растительной или бесклеточной системе (см., например, Galeffi, P., et al., 2006 J Transl Med 4:39).

В дополнение к нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей диверсифицированный иммуноглобулиновый домен, рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, участки начала репликации) и селективируемые маркерные гены. Селективируемый маркерный ген облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые встраивают вектор (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017). Например, как правило, селективируемый маркерный ген придает резистентность к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую встраивают вектор. Предпочтительные селективируемые маркерные гены включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в dhfr⁻ клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией метотрексатом) и ген neo (для селекции G418).

В примере системы для рекомбинантной экспрессии антитела или его антигенсвязывающей части рекомбинантный экспрессирующий вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, встраивают в dhfr CHO клетки путем опосредованной фосфатом кальция трансфекции. В рекомбинантном экспрессирующем векторе каждый из генов тяжелой и легкой цепи антитела функционально связан с энхансерными/промоторными регуляторными элементами (например, происходящими из SV40, CMV, аденовируса и т.п., такими как CMV энхансер/AdMLP промотор или SV40 энхансер/AdMLP промотор) для управления высокими уровнями транскрипции генов. Рекомбинантный экспрессирующий вектор также несет ген DHFR, делающий возможной селекцию CHO клеток, трансфицированных вектором с использованием селекции/амплификации метотрексатом. Подвергнутые селекции трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы сделать возможной экспрессию тяжелых и легких цепей антитела, и интактное антитело выделяют из культуральной среды. Для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора для трансфекции клеток-хозяев, селекции трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела из среды для культивирования используют стандартные методы молекулярной биологии. Например, некоторые антитела можно выделять посредством аффинной хроматографии с протеином А или протеином G.

В случае антител, включающих Fc-домен, система для продукции антител может продуцировать антитела, в которых Fc область гликозилирована. Например, Fc домен молекул IgG гликозилирован по аспарагину 297 в домене CH2. Этот аспарагин является участком для модификации олигосахаридами 2-антеннарного типа. Показано, что это гликозилирование необходимо для эффекторных функций, опосредованных Fcγ рецепторами и комплементом C1q (Burton and Woof, 1992, Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). В одном из вариантов осуществления Fc домен продуцируется в системе экспрессии млекопитающего, которая соответствующим образом гликозилирует остаток, соответствующий аспарагину 297. Fc домен также может включать другие эукариотические посттрансляционные модификации.

Антитела также могут продуцироваться трансгенным животным. Например, в патенте США № 5849992 описан способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, включающий специфичный для молока промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело, и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, продуцируемое женскими особями таких трансгенных млекопитающих, включает секретируемое в нем антитело, представляющее интерес. Антитело можно очистить из молока или, для некоторых применений, использовать непосредственно.

Фармацевтические композиции

Антитело, представленное в настоящем изобретении (например, DX-2930), может присутствовать в композиции, например, фармацевтически приемлемой композиции или фармацевтической композиции. Антитело, представленное в настоящем изобретении (например, DX-2930), можно сформулировать вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления 150 мг или 300 мг 30-400 мг DX-2930 антитела присутствуют в композиции, необязательно, с фармацевтически приемлемым носителем, например, в фармацевтически приемлемой композиции или фармацевтической композиции.

Фармацевтически приемлемый носитель включает любой и все из растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и замедляющих абсорбцию средств и т.п., являющихся физиологически совместимыми. Предпочтительно, носитель подходит для подкожного, внутривенного, внутримышечного, парентерального, спинномозгового или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии), хотя также предусмотрены носители, подходящие для ингаляции и интраназального введения.

Фармацевтически приемлемый носитель в фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении, может включать один или более буферных агентов, аминокислот и регуляторов тоничности. Любой подходящий буферный агент или комбинацию буферных агентов можно использовать в фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении, для поддержания или способство-

вания поддержанию подходящего уровня pH композиции. Неограничивающие примеры буферных агентов включают фосфат натрия, фосфат калия, лимонную кислоту, сукцинат натрия, гистидин, Tris и ацетат натрия. В некоторых вариантах осуществления буферные агенты можно использовать при концентрации около 5-100 мМ, 5-50 мМ, 10-50 мМ, 15-50 мМ или около 15-40 мМ. Например, один или более буферных агентов можно использовать при концентрации около 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ, 30 мМ, 31 мМ, 32 мМ, 33 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 37 мМ, 38 мМ, 39 мМ или около 40 мМ. В некоторых примерах, фармацевтически приемлемый носитель включает фосфат натрия и лимонную кислоту, которые можно использовать при концентрации около 30 мМ и около 19 мМ соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемый носитель включает одну или более аминокислот, которые могут снизить агрегацию антитела и/или повысить стабильность антитела во время хранения до введения. Типичные аминокислоты для применения в получении фармацевтических композиций, описанных в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, глицин, гистидин, лизин, пролин или серии. В некоторых примерах концентрация аминокислоты в фармацевтической композиции может составлять около 5-100 мМ, 10-90 мМ, 20-80 мМ, 30-70 мМ, 40-60 мМ или около 45-55 мМ. В некоторых примерах концентрация аминокислоты (например, гистидина) может составлять около 40 мМ, 41 мМ, 42 мМ, 43 мМ, 44 мМ, 45 мМ, 46 мМ, 47 мМ, 48 мМ, 49 мМ, 50 мМ, 51 мМ, 52 мМ, 53 мМ, 54 мМ, 55 мМ, 56 мМ, 57 мМ, 58 мМ, 59 мМ или около 60 мМ. В одном примере фармацевтическая композиция содержит гистидин в концентрации около 50 мМ.

Любой подходящий регулятор тоничности можно использовать для получения фармацевтических композиций, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления регулятор тоничности представляет собой соль или аминокислоту. Примеры подходящих солей включают, без ограничения, хлорид натрия, сукцинат натрия, сульфат натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат магния и хлорид кальция. В некоторых вариантах осуществления регулятор тоничности в фармацевтической композиции может находиться в концентрации около 10-150 мМ, 50-150 мМ, 50-100 мМ, 75-100 мМ или около 85-95 мМ. В некоторых вариантах осуществления, регулятор тоничности может находиться в концентрации около 80 мМ, 81 мМ, 82 мМ, 83 мМ, 84 мМ, 85 мМ, 86 мМ, 87 мМ, 88 мМ, 89 мМ, 90 мМ, 91 мМ, 92 мМ, 93 мМ, 94 мМ, 95 мМ, 96 мМ, 97 мМ, 98 мМ, 99 мМ или около 100 мМ. В одном примере регулятором тоничности может быть хлорид натрия, который может находиться в концентрации около 90 мМ.

Фармацевтически приемлемый носитель в фармацевтических композициях, представленных в настоящем изобретении, может дополнительно включать один или более фармацевтически приемлемый эксципиентов. Как правило, фармацевтически приемлемые эксципиенты являются фармакологически неактивными веществами. Неограничивающие примеры эксципиентов включают лактозу, глицерин, ксилит, сорбит, маннит, мальтозу, инозит, трегалозу, глюкозу, бычий сывороточный альбумин (БСА), декстран, поливинилацетат (ПВА), гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), полиэтиленмин (ПЭИ), желатин, поливинилпирролидон (ПВП), гидроксипропилцеллюлозу (HEC), полиэтиленгликоль (ПЭГ), этиленгликоль, глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (DMFA), полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат (Tween-20), полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (Tween-80), додецилсульфат натрия (SDS), полисорбат, полиоксиэтиленовый сополимер, фосфат калия, ацетат натрия, сульфат аммония, сульфат магния, сульфат натрия, триметиламин N-оксид, бетаин, ионы цинка, ионы меди, ионы кальция, ионы марганца, ионы магния, CHAPS, монолаурат сахарозы и 2-O-бета-манноглицерат. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель включает эксципиент в пределах около 0,001%-0,1%, 0,001%-0,05%, 0,005-0,1%, 0,005%-0,05%, 0,008%-0,05%, 0,008%-0,03% или около 0,009%-0,02%. В некоторых вариантах осуществления эксципиент составляет около 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% или около 0,1%. В некоторых вариантах осуществления эксципиент представляет собой полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (Tween-80). В одном примере фармацевтически приемлемый носитель содержит 0,01% Tween-80.

В некоторых примерах фармацевтическая композиция, описанная в настоящем изобретении, включает анти-pKa1 антитело, как также описано в настоящем изобретении (например, DX-2930), и один или более из фосфата натрия (например, двухосновный фосфат натрия дигидрат), лимонной кислоты (например, моногидрат лимонной кислоты), гистидина (например, L-гистидин), хлорида натрия, и Полисорбата 80. Например, фармацевтическая композиция может включать антитело, фосфат натрия, лимонную кислоту, гистидин, хлорид натрия и Полисорбат 80. В некоторых примерах антитело сформулировано в примерно 30 мМ фосфата натрия, около 19 мМ лимонной кислоты, около 50 мМ гистидина, около 90 мМ хлорида натрия и около 0,01% Полисорбата 80. Концентрация антитела (например, DX-2930) в композиции может составлять около 150 мг/мл или 300 мг/мл. В одном примере композиция включает или состоит из около 150 мг DX-2930 на 1 мл раствора, около 30 мМ двухосновного фосфата натрия дигидрата, около 19 мМ (например, 19,6 мМ) моногидрата лимонной кислоты, около 50 мМ L-гистидина, около 90 мМ хлорида натрия и около 0,01% Полисорбата 80. В другом примере композиция включает или состоит из около 300 мг DX-2930 на 1 мл раствора, около 30 мМ двухосновного фосфата натрия дигидрата, около 19 мМ (например, 19,6 мМ) моногидрата лимонной кислоты, около 50 мМ L-гистидина, около

90 мМ хлорида натрия и около 0,01% Полисорбата 80.

Фармацевтически приемлемая соль является солью, сохраняющей желаемую биологическую активность соединения и не имеющей каких-либо нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al., 1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, ортофосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Основно-аддитивные соли включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглуксамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Композиции могут иметь множество форм. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Многие композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов, таких как композиции, аналогичные тем, которые используют для введения людям с антителами. Примером способа введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, интраперитонеальный, внутримышечный). В одном варианте осуществления белок, связывающий калликреин плазмы, вводят посредством внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления белок, связывающий калликреин плазмы, вводят посредством внутримышечной или подкожной инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления белок, связывающий калликреин плазмы, вводят посредством интраперитонеальной инъекции.

Фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" в контексте изобретения означают способы введения, иные, чем энтеральное и местное введение, как правило, посредством инъекции, и включают, в качестве неограничивающих примеров, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратрахеальную, интрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят подкожно.

Композицию можно сформулировать в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения связывающего белка в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают посредством включения активного соединения в стерильный наполнитель, содержащий основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, посредством которой получают порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из ранее стерилизованного фильтрацией раствора. Подходящую текучесть раствора можно поддерживать, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может достигаться посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно вводить множеством способов, включая внутривенную инъекцию или инфузию. Например, для некоторых терапевтических применений антитело можно вводить посредством внутривенной инфузии со скоростью менее 30, 20, 10, 5 или 1 мг/мин для достижения дозы приблизительно от 1 до 100 мг/м² или от 7 до 25 мг/м². Путь и/или способ введения может варьироваться в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах осуществления активное соединение можно получать с использованием носителя, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в виде композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Доступно множество способов получения таких композиций. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств. Например, в одном варианте осуществления фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, можно вводить с использованием устройства, например, безыгольного подкожного инъекционного устройства, насоса или имплантата.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно сформулировать для обеспечения правильной дистрибуции *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения того, чтобы терапевтические соединения, раскрытые в настоящем изобретении, пересекали BBB (при желании), их можно сформулировать, например, в липосомах. Способы получения липосом, см., например, в патентах США №№ 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут включать один или более фрагментов, селективно транспортируемых в конкретные клетки или органы, таким образом, повышая доставку целевого лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685).

Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болус, можно вводить несколько отдельных доз в течение определенного времени, или дозу можно пропорционально снижать или повышать в зависимости от терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно, когда парентеральные композиции сформулированы в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и равномерного дозирования. В контексте настоящего изобретения, стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для достижения желаемого терапевтического эффекта, вместе с желаемым фармацевтическим носителем. Требования к стандартным лекарственным формам могут определяться и напрямую зависеть от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого хотят достичь, и (b) ограничений, характерных для области компаундирования такого активного соединения, для лечения чувствительности у индивидуумов.

Иллюстративный неограничивающий диапазон для терапевтически или профилактически эффективного количества антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930), составляет около 150 мг или 300 мг. Как будет понятно специалисту в данной области, терапевтически или профилактически эффективное количество антитела может быть ниже для педиатрического субъекта, чем для взрослого субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество, которое вводят педиатрическому субъекту, представляет собой фиксированную дозу или зависящую от массы тела дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество, которое составляет меньше чем около 150 мг или 300 мг, вводят педиатрическому субъекту. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела вводят через каждые две недели или каждые четыре недели в течение первого периода лечения. В некоторых вариантах осуществления антитело можно вводить субъекту в течение второго периода лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела в первый период лечения отличается от терапевтически или профилактически эффективного количества антитела во втором периоде лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела в первый период лечения составляет 150 мг, и терапевтически или профилактически эффективное количество антитела во второй период лечения составляет 300 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела в первый период лечения является таким же, как терапевтически или профилактически эффективное количество антитела во втором периоде лечения. В одном примере терапевтически или профилактически эффективное количество антитела в первый период лечения и второй период лечения составляет 300 мг.

В некоторых вариантах осуществления типичный, неограничивающий диапазон для терапевтически или профилактически эффективного количества антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930), составляет около 300 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела вводят в разовой дозе. Если субъект испытывает обострение НАЕ, антитело можно дополнительно вводить субъекту в нескольких дозах, таких, как около 300 мг, вводимых через каждые две недели.

Наборы

Антитело, описанное в настоящем изобретении (например, DX-2930), может быть предоставлено в наборе, например, в виде компонента набора. Например, набор включает (а) антитело DX-2930, например, композицию (например, фармацевтическую композицию), включающую антитело, и, необязательно, (b) информационный материал. Информационный материал может являться описательным, инструктивным, маркетинговым или другим материалом, относящимся к способу, представленному в настоящем изобретении, и/или применению антитела, как описано в настоящем изобретении (например, DX-2930), например, для способа, представленного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одну или более доз DX-2930. В некоторых вариантах осуществления одна или более доз составляют 150 мг или 300 мг.

Информационный материал из набора не ограничен в своей форме. В одном из вариантов осуществления информационный материал может включать информацию о получении соединения, молекулярной массе соединения, концентрации, сроке годности, партии или месте получения и т.д. В одном из вариантов осуществления информационный материал относится к применению антитела для лечения, профилактики или диагностики расстройств и состояний, например, заболевания или состояния, ассоцииро-

ванного с калликреином плазмы.

В одном варианте осуществления информационный материал может включать инструкции по введению антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930), подходящим образом для осуществления способов, представленных в настоящем изобретении, например, в подходящей дозе, лекарственной форме, с использованием подходящего способа или схемы введения (например, с использованием дозы, лекарственной формы, схемы или способа введения, описанных в настоящем изобретении). В другом варианте осуществления информационный материал может включать инструкции по введению антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930), подходящему субъекту, например, человеку, например, человеку, страдающему или имеющему риск развития заболевания или состояния, ассоциированного с калликреином плазмы. Например, материал может включать инструкции по введению антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930), пациенту с расстройством или состоянием, описанным в настоящем изобретении, например, заболеванием, ассоциированным с калликреином плазмы, например, в соответствии со схемой введения, представленной в настоящем изобретении. Информационный материал из наборов не ограничен в своей форме. Во многих случаях информационный материал, например, инструкции, представлен в печатном виде, но также может быть представлен в других форматах, таких как машиночитаемый материал.

Антитело, описанное в настоящем изобретении (например, DX-2930), может быть представлено в любой форме, например, жидкой, высушенной или лиофилизированной форме. Предпочтительно, чтобы антитело являлось, по существу, чистым и/или стерильным. Если антитело представлено в жидком растворе, жидкий раствор, предпочтительно, является водным раствором, при этом стерильный водный раствор является предпочтительным. Если антитело представлено в высушенной форме, восстановление, как правило, осуществляют посредством добавления подходящего растворителя. Растворитель, например, стерильная вода или буфер, необязательно может обеспечиваться в наборе.

Набор может включать один или более контейнеров для композиции, содержащей антитело, описанное в настоящем изобретении (например, DX-2930). В некоторых вариантах осуществления набор содержит отдельные контейнеры, разделители или отделения для композиции и информационного материала. Например, композиция может содержаться в бутылке, сосуде или шприце, и информационный материал может содержаться вместе с контейнером. В других вариантах осуществления отдельные элементы набора содержатся в едином неразделенном контейнере. Например, композиция содержится в бутылке, сосуде или шприце с прикрепленным информационным материалом в форме этикетки. В некоторых вариантах осуществления набор включает множество (например, комплект) отдельных контейнеров, каждый из которых содержит одну или более стандартных лекарственных форм (например, лекарственную форму, представленную в настоящем изобретении) антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930). Например, набор включает множество шприцов, ампул, пакетов из фольги или блистеров, каждый из которых содержит одну стандартную дозу антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930). Контейнеры из наборов могут быть герметизированными, водонепроницаемыми (например, непроницаемыми для изменений влажности или испарения) и/или светонепроницаемыми.

Набор, необязательно, включает устройство, подходящее для введения композиции, например, шприц или любое такое устройство для доставки. В одном варианте осуществления устройство является имплантируемым устройством, при помощи которого распределяют отмеренные дозы антитела. Настоящее раскрытие также относится к способу получения набора, например, посредством комбинирования компонентов, описанных в настоящем изобретении.

Лечение

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает применение антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930), в лечении НАЕ.

(i) Наследственный ангионевротический отек.

Наследственный ангионевротический отек (НАЕ) также известен как "отек Квинке", недостаточность ингибитора С1-эстеразы, недостаточность ингибитора С1 и наследственный ангионевротический отек (НАНЕ). НАЕ отличается непредсказуемыми повторяющимися приступами тяжелой подкожной или подслизистой опухоли (ангионевротический отек), которая может поражать, например, конечности, лицо, гениталии, желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути (Zigaw, 2008). Симптомы НАЕ включают отек рук, ног, губ, глаз, языка и/или горла; блокаду дыхательных путей, которая может включать отек горла, внезапную хрипоту и/или вызвать смерть от удушья (Bork et al., 2012; Bork et al., 2000). Приблизительно 50% всех пациентов с НАЕ будут испытывать ларингеальный приступ в течение своей жизни, и нет никакого способа предсказать, какие пациенты подвержены риску ларингеального приступа (Bork et al., 2003; Bork et al., 2006). Симптомы НАЕ также включают повторные эпизоды абдоминальных спазмов без очевидной причины; и/или отек кишечника, который может быть тяжелым и может приводить к спазмам в животе, рвоте, обезвоживанию, диарее, боли, шоку и/или кишечным симптомам, сходным с абдоминальными чрезвычайными ситуациями, что может привести к ненужной хирургической операции (Zigaw, 2008). Отек может продолжаться до пяти или более дней. Приблизительно у трети индивидуумов с НАЕ во время приступа развивается зудящая сыпь под названием ревматиче-

ская эритема. Большинство пациентов испытывают несколько приступов в год.

НАЕ является орфанным расстройством, точное распространение которого неизвестно, но текущие оценки варьируются от 1 на 10000 до 1 на 150000 человек, причем многие авторы согласны с тем, что 1 на 50000, вероятно, является самой близкой оценкой (Bygum, 2009; Goring et al., 1998; Lei et al., 2011; Nordenfelt et al., 2014; Roche et al., 2005).

Калликреин плазмы играет критическую роль в патогенезе обострений НАЕ (Davis, 2006; Kaplan и Joseph, 2010). В нормальной физиологии C1-INH регулирует активность калликреина плазмы, а также множества других протеаз, таких как C1r, C1s, фактор XIa и фактор XIIa. Калликреин плазмы регулирует высвобождение брадикинина из высокомолекулярного кининогена (HMWK). Из-за дефицита C1-INH при НАЕ происходит неконтролируемая активность калликреина плазмы и приводит к чрезмерной генерации брадикинина. Брадикинин является вазодилататором, который, как считается, ответственен за характерные симптомы НАЕ, такие как локализованный отек, воспаление и боль (Craig et al., 2012; Zuraw et al., 2013).

Отек дыхательных путей может угрожать жизни и вызывать гибель некоторых пациентов. По оценкам коэффициенты смертности составляют 15-33%. НАЕ приводит к приблизительно 15000-30000 посещениям отделения неотложной помощи в год.

Травма или стресс, например, стоматологические процедуры, болезнь (например, вирусные заболевания, такие как простуда и грипп), менструация и хирургическое вмешательство могут запускать приступ ангионевротического отека. Для профилактики острых приступов НАЕ пациенты могут пытаться избегать конкретных стимулов, ранее вызывавших приступы. Однако во многих случаях приступ происходит в отсутствие известного триггера. Как правило, симптомы НАЕ сначала появляются в детстве и ухудшаются в течение полового созревания. В среднем, не подвергавшиеся лечению индивидуумы имеют приступы каждые 1-2 недели, и большинство эпизодов длятся в течение приблизительно от 3 до 4 дней (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema). Частота и длительность приступов значительно варьируются среди людей с наследственным ангионевротическим отеком даже среди людей в одной семье.

Существует три типа НАЕ, известных как типы I, II и III, все из которых можно лечить способами, описанными в настоящем изобретении. Считают, что НАЕ поражает 1 на 50000 человек, при этом на тип I приходится приблизительно 85 процентов случаев, на тип II приходится приблизительно 15 процентов случаев, а тип III является очень редким. Тип III является самым последним из описанных форм, и сначала считали, что он развивается только у женщин, но были выявлены семьи с больными мужчинами.

НАЕ наследуется по аутосомно-доминантному типу таким образом, что больной индивидуум может наследовать мутацию от одного больного родителя. Также могут возникать новые мутации в гене, и, таким образом, НАЕ также может развиваться у людей без нарушения в семейном анамнезе. Считают, что 20-25% случаев являются результатом новой спонтанной мутации.

Мутации в гене SERPING1 вызывают наследственный ангионевротический отек типа I и типа II. Ген SERPING1 обеспечивает инструкции для образования ингибиторного белка C1, важного для контроля воспаления. C1-ингибитор блокирует активность некоторых белков, стимулирующих воспаление. Мутации, вызывающие наследственный ангионевротический отек типа I, приводят к сниженным уровням C1-ингибитора в крови. И наоборот, мутации, вызывающие тип II, приводят к продукции C1-ингибитора, функционирующего аномально. Приблизительно 85% пациентов имеют тип I НАЕ, характеризующийся очень низким продуцированием функционально нормального C1-INH белка, в то время как остальные приблизительно 15% пациентов имеют тип II НАЕ и имеют нормальные или повышенные уровни функционально нарушенного C1-INH (Zuraw, 2008). Без правильных уровней функционального C1-ингибитора образуются избыточные количества брадикинина из высокомолекулярного кининогена (HMWK), наблюдается повышенное протекание жидкости через сосуды, опосредованное связыванием брадикинина с B2-рецептором (B2-R) на поверхности эндотелиальных клеток (Zuraw, 2008). Брадикинин способствует воспалению, увеличивая просачивание жидкости через стенки кровеносных сосудов в ткани тела. Чрезмерное накопление жидкостей в тканях организма вызывает эпизоды отека, наблюдаемые у людей с наследственным ангионевротическим отеком типа I и типа II.

Мутации в гене F12 ассоциированы с некоторыми случаями наследственного ангионевротического отека типа III. Ген F12 обеспечивает инструкции для образования фактора свертывания XII. В дополнение к критической роли в свертывании крови (коагуляции), фактор XII также является важным стимулятором воспаления и участвует в продукции брадикинина. Конкретные мутации в гене F12 приводят к продукции фактора XII с повышенной активностью. В результате образуется больше брадикинина и стенки кровеносных сосудов становятся более проницаемыми, что приводит к эпизодам отека. Причина других случаев наследственного ангионевротического отека типа III остается неизвестной. Мутации в одном или более еще неидентифицированных генах могут отвечать за нарушение в этих случаях.

НАЕ может быть аналогичным другим формам ангионевротического отека, являющихся результатом аллергий или других медицинских состояний, но значительно отличается от них, что касается причины и лечения. Если наследственный ангионевротический отек неправильно диагностируют как аллергию, его чаще всего лечат антигистаминными средствами, стероидами и/или эпинефрином, как правило, являющимися неэффективными при НАЕ, хотя в случае реакций, угрожающих жизни, можно использовать эпинефрин. Неправильный диагноз также приводит к необязательному диагностическому хирургическому

ческому вмешательству в случае пациентов с абдоминальным отеком, и у некоторых пациентов с НАЕ абдоминальную боль неправильно диагностируют как психосоматическую.

Как и взрослые, дети с НАЕ могут страдать от повторяющихся и изнурительных приступов. Симптомы могут проявляться очень рано в детстве, и ангионевротический отек верхних дыхательных путей был зарегистрирован у пациентов с НАЕ в возрасте от 3 лет (Bork et al., 2003). В одном из исследований 49 пациентов с педиатрическим НАЕ, 23 были подвержены по меньшей мере одному эпизоду ангионевротического отека дыхательных путей в возрасте до 18 лет (Farkas, 2010). Существует огромная неудовлетворенная потребность в медицинском лечении среди детей с НАЕ, особенно подростков, поскольку заболевание обычно ухудшается после полового созревания (Bennett и Craig, 2015; Zuraw, 2008).

C1 ингибиторные терапии, а также другие терапии НАЕ описаны в Kaplan, A.P., *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126 (5):918-925.

Неотложное лечение приступов НАЕ предпринимают для прекращения прогрессирования отека так быстро, как это возможно. Концентрат C1-ингибитора из донорской крови, вводимый внутривенно, является одним неотложным лечением; однако, это лечение недоступно во многих странах. В чрезвычайных ситуациях, когда концентрат C1 ингибитора недоступен, в качестве альтернативы можно использовать свежую замороженную плазму (FFP), т.к. она также содержит C1 ингибитор.

Очищенный C1 ингибитор, полученный из крови человека, используют в Европе с 1979 года. Несколько лекарственных средств на основе C1 ингибитора теперь доступны в США, и два продукта C1 ингибитора теперь доступны в Канаде. Беринерт P (CSL Behring), являющийся пастеризованным, одобрен F.D.A. в 2009 году для острых приступов. Цинриз (ViroPharma), подвергаемый нанофильтрации, одобрен F.D.A. в 2008 году для профилактики. Рудин (Pharming) является рекомбинантным C1 ингибитором, находящимся в стадии разработки, не несущим риск передачи инфекционного заболевания из-за переносимых с кровью человеческих патогенов.

Лечение острого приступа НАЕ также может включать лекарственные средства для обезболивания и/или вводимые IV (внутривенно) жидкости.

Другие способы лечения могут стимулировать синтез C1 ингибитора или снижать потребление C1 ингибитора. Андрогенные лекарственные средства, такие как даназол, могут снижать частоту и тяжесть приступов посредством стимуляции продукции C1 ингибитора.

Helicobacter pylori могут запускать абдоминальные приступы. Антибиотики для лечения *H. pylori* будут снижать абдоминальные приступы.

Более новые лекарственные средства воздействуют на контактный каскад. Экаллантин (KALBITOR®, DX-88, Duax) ингибирует калликреин плазмы и одобрен в США. Икатибант (FIRAZYR®, Shire) ингибирует рецептор брадикинина B2 и одобрен в Европе и США.

Диагноз НАЕ может быть основан, например, на семейном анамнезе и/или анализах крови. Лабораторные показатели, ассоциированные с НАЕ типов I, II и III, описаны, например, в Kaplan, A.P., *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126 (5) :918-925. При НАЕ типа I уровень C1- ингибитора снижен, как и уровень C4, в то время как уровень C1q является нормальным. При НАЕ типа II уровень C1 ингибитора является нормальным или повышенным; однако функция C1 ингибитора аномальна. Уровень C4 снижен, и уровень C1q является нормальным. При типе III уровни C1 ингибитора, C4 и C1q все могут быть нормальными.

Симптомы НАЕ можно оценивать, например, с использованием опросников, например, опросников, заполняемых пациентами, клиницистами или членами семьи. Такие опросники известны в данной области и включают, например, визуальные аналоговые шкалы. См., например, McMillan, C.V. et al. *Patient*. 2012;5 (2):113-26. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет НАЕ типа I или НАЕ типа II. НАЕ типа I или НАЕ типа II может быть диагностирован с использованием любого известного в данной области метода, такого как клиническая история, указывающая на НАЕ (например, эпизоды подкожного или слизистого незудящего отека) или диагностическое тестирование (например, функциональное тестирование C1-INH и оценка уровня C4) (ii) Лечение НАЕ анти-pKal антителами Настоящее изобретение относится к способам лечения (например, улучшения, стабилизации или устранения одного или более симптомов) наследственного ангионевротического отека (НАЕ) посредством введения антитела, описанного в настоящем изобретении (например, терапевтически эффективного количества антитела, описанного в настоящем изобретении), субъекту, страдающему или имеющему подозрение на НАЕ, например, в соответствии со схемой дозирования, описанной в настоящем изобретении. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения НАЕ посредством введения антитела, описанного в настоящем изобретении (например, терапевтически эффективного количества антитела, описанного в настоящем изобретении), например, в соответствии со схемой дозирования, описанной в настоящем изобретении, или в комбинации с второй терапией, например, с использованием одного другого средства, например, описанного в настоящем изобретении. Настоящее изобретение также относится к способам профилактики НАЕ или его симптома посредством введения антитела, описанного в настоящем изобретении (например, профилактически эффективного количества антитела, описанного в настоящем изобретении), субъекту, имеющему риск развития НАЕ (например, субъекту, имеющему члена семьи с НАЕ или с генетической предрасположенностью к нему), например, в соответствии со схемой дозирования, описанной в настоящем изобретении. В некоторых примерах субъект может являться пациентом-человеком, не име-

ющим симптомов НАЕ на момент лечения. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент-человек с НАЕ типа I или НАЕ типа II. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент-человек, который испытал по меньшей мере два (например, 2, 3, 4, 5 или более) приступа НАЕ за год до лечения.

Лечение включает введение количества, эффективного для облегчения, ослабления тяжести, лечения, улучшения или влияния на расстройство, симптомы расстройства или предрасположенность к расстройству. Лечение также может замедлять начало болезни, например, предотвращать начало болезни или предотвращать ухудшение заболевания или состояния.

Способы введения DX-2930 антител также описаны в разделе "Фармацевтические композиции". Используемые подходящие дозы антитела могут зависеть от возраста и массы тела субъекта и конкретного используемого лекарственного средства. Антитело можно использовать в качестве конкурентных средств для ингибирования, снижения нежелательного взаимодействия, например, между калликреином плазмы и его субстратом (например, фактором XII или HMWK). Доза антитела может представлять собой количество, достаточное для блокирования 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% активности калликреина плазмы у пациента, особенно в очаге заболевания. В некоторых вариантах осуществления 150 мг или 300 мг антитела вводят через каждые две недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления 300 мг антитела вводят в разовой дозе. Если субъект испытывает приступ НАЕ после разовой дозы, антитело можно вводить по 300 мг через каждые две недели.

В одном варианте осуществления антитела используют для ингибирования активности калликреина плазмы (например, ингибирования по меньшей мере одной активности калликреина плазмы, например, снижения продукции фактора XIIa и/или брадикинина), например, *in vivo*. Связывающие белки можно использовать как таковые или конъюгированными со средством, например, цитотоксическим лекарственным средством, цитотоксином, ферментом или радиоактивным изотопом.

Антитела можно использовать непосредственно *in vivo* для устранения антигенэкспрессирующих клеток посредством природной комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Антитела, представленные в настоящем описании, могут включать комплемент-связывающий эффекторный домен, такой как Fc части из IgG1, -2 или -3 или соответствующие части IgM, связывающие комплемент. В одном из вариантов осуществления популяцию клеток-мишеней обрабатывают *ex vivo* антителом, представленным в настоящем описании, и подходящими эффекторными клетками. Обработку можно дополнять добавлением комплемента или сыворотки, содержащей комплемент. Кроме того, фагоцитоз клеток-мишеней, покрытых антителом, представленным в настоящем описании, можно улучшить путем связывания белков комплемента. В другом варианте осуществления клетки-мишени, покрытые антителом, включающим комплемент-связывающий эффекторный домен, лизируют с помощью комплемента.

Способы введения DX-2930 антител описаны в разделе "Фармацевтические композиции". Подходящие дозы используемых молекул будут зависеть от возраста и массы тела субъекта и конкретного используемого лекарственного средства. Антитела можно использовать в качестве конкурентных средств для ингибирования или снижения нежелательного взаимодействия, например, между природным или патологическим веществом и калликреином плазмы.

Терапевтически эффективное количество антитела, описанного в настоящем изобретении, можно вводить субъекту, имеющему, имеющему подозрение на, или имеющему риск развития НАЕ, таким образом, осуществляя лечение (например, облегчение, улучшение симптома или признака расстройства, замедление, стабилизацию и/или задержку прогрессирования заболевания) расстройства.

Антитело, описанное в настоящем изобретении, можно вводить в терапевтически эффективном количестве. Терапевтически эффективное количество антитела является количеством, эффективным после введения однократной или более доз субъекту при лечении субъекта, например, излечении, облегчении или улучшении по меньшей мере одного симптома расстройства у субъекта до степени, которая выше ожидаемой в отсутствие такого лечения.

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько раздельных доз в течение определенного периода времени, или дозу можно пропорционально снижать или повышать в зависимости от терапевтической ситуации. В других примерах можно вводить болюс с последующим несколькими дозами в течение определенного периода времени, или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как диктует терапевтическая ситуация. В других примерах дозу можно разделить на несколько доз и вводить в течение определенного периода времени. Особенно предпочтительно, когда парентеральные композиции сформулированы в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и равномерного дозирования. В контексте настоящего изобретения, стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для достижения желаемого терапевтического эффекта, вместе с желаемым фармацевтическим носителем.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, вводят в ре-

жиме дозирования во время первого периода лечения. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в первый период лечения в нескольких дозах. В этот период терапевтически или профилактически эффективное количество антитела (например, DX-2930) может составлять около 150 мг или 300 мг, и его вводят каждую неделю, через каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые пять недель, каждые шесть недель, каждые семь недель, каждые восемь недель или дольше. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела (например, DX-2930) может составлять около 150 мг или 300 мг, и его вводят через каждые две недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество вводят по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, по меньшей мере восемь раз, по меньшей мере девять раз, по меньшей мере десять раз, по меньшей мере одиннадцать раз, по меньшей мере двенадцать раз, по меньшей мере тринадцать раз или более. В некоторых вариантах осуществления первый период лечения составляет 26 недель. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 150 мг, и его вводят субъекту через каждые четыре недели (например, через каждые четыре недели в течение 26 недель, что приводит к доставке в общей сложности 7 доз). В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 300 мг, и его вводят субъекту через каждые две недели (например, каждые две недели в течение 26 недель, что приводит к доставке в общей сложности 13 доз).

В одном примере первый период лечения составляет 26 недель, и антитело вводят в день 0, день 28, день 56, день 84, день 112, день 140 и день 168. В другом примере первый период лечения составляет 26 недель, и антитело вводят в день 0, день 14, день 28, день 42, день 56, день 70, день 84, день 98, день 112, день 126, день 140, день 154 и день 168. Специалистам в данной области должно быть понятно, что приведенная схема лечения позволяет использовать окно ± 4 дня (например, ± 3 дня, ± 2 дня или ± 1 день). Например, доза, вводимая в день 10-18, будет охватываться дозой дня 14, отмеченной выше.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество вводят в режиме дозирования во время второго периода лечения после первого периода лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество является разным в первый период лечения и второй период лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество для второго периода лечения составляет около 300 мг. В течение этого периода антитело можно вводить в многократных дозах около 300 мг, таких как 300 мг, вводимые через каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления во втором периоде лечения многократные дозы антитела вводят по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, по меньшей мере восемь раз, по меньшей мере девять раз, по меньшей мере десять раз, по меньшей мере одиннадцать раз, по меньшей мере двенадцать раз, по меньшей мере тринадцать раз. В некоторых вариантах осуществления второй период лечения составляет 26 недель. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят при дозе около 300 мг через каждые две недели в течение 26 недель (например, что приводит к доставке 13 доз). В некоторых вариантах осуществления разовую первую дозу второго периода лечения вводят примерно через две недели после последней дозы первого периода лечения.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем изобретении, время введения антитела является приблизительным и может включать три дня до и три дня после указанного дня (например, введение через каждые две недели охватывает введение в день 11, день 12, день 13, день 14, день 15, день 16 или день 17).

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, вводят в разовой дозе около 300 мг субъекту, перенесшему предшествующее лечение НАЕ (первое лечение), такое как многодозовое лечение с тем же анти-rKa1 антителом, как описано в настоящем изобретении (например, DX-2930). Если субъект испытывает обострение НАЕ после разовой дозы, субъект может принимать лечение антителом в многократных дозах около 300 мг через каждые две недели в течение подходящего периода, например, 26 недель. В некоторых вариантах осуществления первую из многократных доз вводят не позднее чем через одну неделю после обострения НАЕ (например, через 1 день, 2, дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после приступа НАЕ). В некоторых вариантах осуществления антитело вводят по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, по меньшей мере восемь раз, по меньшей мере девять раз, по меньшей мере десять раз, по меньшей мере одиннадцать раз, по меньшей мере двенадцать раз, по меньшей мере тринадцать раз или более.

Предшествующее лечение НАЕ может включать то же антитело, как описано в настоящем изобретении (например, DX-2930). В некоторых вариантах осуществления предшествующее лечение НАЕ может включать многократные дозы DX-2930 через каждые две недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления DX-2930 вводят субъекту (например, подкожно) при дозе 150 мг через каждые две недели, при дозе 300 мг через каждые две недели или при дозе 300 мг через каждые четыре недели. В одном примере субъекту ранее вводили антитело через каждые две недели или четыре недели

в течение 26 недель до введения разовой дозы антитела. В некоторых вариантах осуществления многократные дозы антитела предшествующего лечения вводят по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, по меньшей мере восемь раз, по меньшей мере девять раз, по меньшей мере десять раз, по меньшей мере одиннадцать раз, по меньшей мере двенадцать раз, по меньшей мере тринадцать раз. В некоторых вариантах осуществления, антитело ранее вводили в день 0, день 28, день 56, день 84, день 112, день 140 и день 168. В некоторых вариантах осуществления разовую дозу около 300 мг антитела вводят примерно через две недели после последней дозы предшествующего лечения. В одном примере разовую дозу второго периода лечения вводят в день 182 первого периода лечения.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем изобретении, время введения антитела является приблизительным и может включать три дня до и три дня после указанного дня (например, введение через каждые две недели охватывает введение на день 11, день 12, день 13, день 14, день 15, день 16 или день 17).

В некоторых вариантах осуществления, до введения антитела в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем изобретении, субъект может быть оценен для установления исходной частоты приступов НАЕ. Такой период оценки можно назвать "вводный период". В некоторых вариантах осуществления исходная частота приступов НАЕ должна соответствовать или превышать минимальное количество приступов НАЕ за данный период времени. В одном примере субъект испытывает по меньшей мере один приступ НАЕ в течение четырехнедельного вводного периода до первого введения антитела. В другом примере субъект испытывает по меньшей мере два приступа НАЕ в течение восьминедельного вводного периода до первого введения антитела.

Любой из субъектов, представленных в настоящем изобретении, может подвергнуться предварительному лечению НАЕ, например, профилактическому или терапевтическому лечению НАЕ. Аспекты настоящего раскрытия также обеспечивают способы введения антитела, описанного в настоящем изобретении (например, DX-2930), субъекту, который получил одно или более предшествующих лечений НАЕ. В некоторых вариантах осуществления предшествующее лечение НАЕ является лечением, которое включает антитело, описанное в настоящем изобретении (например, DX-2930). В некоторых вариантах осуществления субъекту ранее вводили многократные дозы DX-2930 через каждые две недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления субъекту ранее вводили 150 мг DX-2930 через каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления субъекту ранее вводили 300 мг DX-2930 через каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления субъекту ранее вводили 300 мг DX-2930 через каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления многократные дозы антитела предшествующего лечения вводят по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, по меньшей мере восемь раз, по меньшей мере девять раз, по меньшей мере десять раз, по меньшей мере одиннадцать раз, по меньшей мере двенадцать раз, по меньшей мере тринадцать раз.

В некоторых вариантах осуществления субъект получал одно или более предшествующих лечений НАЕ, которые могут включать любое терапевтическое средство для лечения НАЕ, известное в данной области. Типичные анти-НАЕ средства включают, но не ограничиваются этим, С1-ингибиторы (например, Цинриз®, Беринерт® или Руконест®), ингибиторы калликреина плазмы (например, Калбитор®), ингибиторы рецептора брадикинина (например, Фиразир®), аттенуированные андрогены (например, даназол), антифибринолитическое средство (например, транексамовая кислота). В некоторых примерах субъект может пройти период постепенного снижения дозы перед получением лечения анти-rKα1 антителом, описанным в настоящем изобретении. Период постепенного снижения дозы относится к периоду, до лечения анти-rKα1 антителом, во время которого субъекту, который проходит анти-НАЕ лечение (например, С1-ИНН, пероральным андрогеном и/или пероральным антифибринолитическими средствами), постепенно уменьшают дозировку, частоту или и то и другое анти-НАЕ средства, чтобы субъект мог постепенно переходить от предшествующего лечения НАЕ к лечению анти-rKα1 антителом, описанным в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления постепенное снижение дозы включает постепенный или ступенчатый способ снижения дозировки и/или частоты введения предшествующего лечения. Период снижения дозировки может длиться 2-4 недели и может варьироваться в зависимости от факторов индивидуального пациента. В некоторых примерах предшествующее лечение прекращают до начала лечения анти-rKα1-антителом. В других примерах предшествующее лечение может заканчиваться в течение подходящего временного интервала (например, 2 недели, 3 недели или 4 недели) после того, как субъект получает свою первую дозу анти-rKα1-антитела.

Альтернативно, субъект, принимающий предшествующее лечение НАЕ, может быть переведен на лечение анти-rKα1-антителом, описанным в настоящем изобретении, сразу без периода снижения дозировки.

В других вариантах осуществления у субъекта отсутствует какое-либо предшествующее лечение НАЕ до первого лечения, первого периода лечения и/или последующих однократных и многократных доз, как описано в настоящем изобретении (второй период лечения). В некоторых вариантах осуществ-

ления у субъекта отсутствует какое-либо лечение, отличное от лечения антителом, описанным в настоящем изобретении, во время первого периода лечения и/или во время второго периода лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта отсутствует какое-либо предшествующее лечение НАЕ в течение по меньшей мере двух недель (например, по меньшей мере две, три, четыре, пять недель или более) перед первым лечением или первым периодом лечения, во время первого лечения или первого периода лечения и/или во время второго периода лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не было долгосрочной профилактики НАЕ (например, С1 ингибитор, аттенуированные андрогены, антифибринолитические средства) в течение по меньшей мере двух недель до первого лечения или первого периода лечения, во время первого периода лечения и/или во время второго периода лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект не принимает лечение НАЕ, включающее ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), в течение по меньшей мере четырех недель до первого лечения или первого периода лечения, во время первого периода лечения и/или во время второго периода лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект не принимает эстрогенсодержащий препарат в течение по меньшей мере четырех недель до первого лечения или первого периода лечения, во время первого периода лечения и/или во время второго периода лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект не принимает андрогены (например, станозолол, даназол, оксандролон, метилтестостерон, тестостерон) в течение по меньшей мере двух недель до первого лечения или первого периода лечения, во время первого периода лечения и/или во время второго периода лечения.

Любой из способов, описанных в настоящем изобретении, может дополнительно включать мониторинг пациента на побочные эффекты (например, повышение уровней креатинфосфатазы) и/или уровни ингибирования рКал антителом (например, концентрацию антитела в сыворотке или плазме или уровень активности рКал) до и после лечения или во время курса лечения. Если наблюдают один или более побочных эффектов, дозу антитела можно снижать или лечение можно прекращать. Если уровень ингибирования ниже минимального терапевтического уровня, пациенту можно вводить дополнительные дозы антитела. Пациенты также могут быть оценены на генерацию антитела против введенного антитела; активность С1-ингибитора, С4 и/или С1q; качество жизни; частоту возникновения любых приступов НАЕ, связанное со здоровьем качество жизни, беспокойство и/или депрессию (например, Госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS)), производительность труда (например, анкетирование относительно нарушения трудоспособности и повседневной деятельности (WPAI)), предпочтение подкожного введения антитела (например, D-2930) по сравнению с другими инъекциями, качество жизни (например, ангионевротический отек - качество жизни (AE-QOL), отчет с 5 результатами измерений EuroQoL Группы).

В некоторых вариантах осуществления концентрацию антитела в плазме или сыворотке (например, DX-2930) можно измерять во время курса лечения (например, после начальной дозы) для оценки эффективности лечения. Если концентрация антитела в плазме или сыворотке является ниже чем около 80 нМ, может потребоваться последующая доза, которая может являться такой же или превышать исходную дозу. Концентрацию антитела в плазме или сыворотке можно измерять путем определения уровня белка антитела в образце плазмы или сыворотки, полученном от субъекта, например, при помощи иммунологического анализа или MS-анализа. Концентрацию антитела в плазме или сыворотке также можно измерять путем определения ингибиторного уровня рКал в образце плазмы или сыворотки, полученном от субъекта, которого лечат антителом. Такие анализы могут включать анализ синтетического субстрата или вестерн-блот анализ для измерения расщепленного кининогена, как описано в настоящем изобретении.

Альтернативно или дополнительно, уровень креатинкиназы в плазме или сыворотке и/или один или более параметров коагуляции (например, активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT), протромбиновое время (PT), случаи кровотечения) можно контролировать во время курса лечения. Если обнаруживают, что уровень креатинкиназы в плазме или сыворотке повышается во время курса лечения, можно уменьшить дозу антитела или можно прекратить лечение. Аналогичным образом, если обнаруживают, что один или более параметров коагуляции значительно изменяется во время лечения, дозировка антитела может быть изменена или лечение может быть прекращено.

В некоторых вариантах осуществления оптимальную дозу (например, оптимальную профилактическую дозу или оптимальную терапевтическую дозу) антитела (например, DX-2930) можно определять следующим образом. Антитело вводят субъекту, нуждающемуся в лечении, в начальной дозе. Измеряют концентрацию антитела в плазме субъекта. Если концентрация в плазме ниже чем 80 нМ, дозу антитела повышают при последующем введении. Дозу антитела, благодаря которой поддерживают концентрацию антитела в плазме выше чем около 80 нМ, можно выбрать как оптимальную дозу для субъекта. Уровень креатинфосфокиназы у субъекта можно контролировать во время курса лечения, и оптимальную дозу для этого субъекта можно дополнительно корректировать с учетом уровня креатинфосфокиназы, например, дозу антитела можно снижать, если наблюдают повышение креатинфосфокиназы во время лечения.

(iii) Комбинированные терапии.

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно вводить в комбинации с одним или более другими терапевтическими средствами для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с активностью калликреина плазмы, например, заболевания или состояния, описанного в настоящем изобретении. Например, антитело, описанное в настоящем изобретении (например, DX-

2930), можно использовать терапевтически или профилактически (например, до, во время или после курса лечения) с другим Fab или IgG против калликреина плазмы (например, другим Fab или IgG, описанным в настоящем изобретении), другим ингибитором калликреина плазмы, пептидным ингибитором, низкомолекулярным ингибитором или хирургическим вмешательством. Примеры ингибиторов калликреина плазмы, которые можно использовать в комбинированной терапии с антителами, связывающими калликреин плазмы, описанными в настоящем изобретении, включают ингибиторы калликреина плазмы, описанные, например, в WO 95/21601 или WO 2003/103475.

Один или более ингибиторов калликреинов плазмы можно использовать в комбинации с антителом, представленным в настоящем изобретении (например, DX-2930). Например, комбинация может приводить к снижению необходимой дозы ингибитора, снижая, таким образом, побочные эффекты.

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно вводить в комбинации с одним или более известными в настоящее время терапевтическими средствами для лечения НАЕ. Например, антитело DX-2930 можно использовать совместно с вторым терапевтическим средством против НАЕ, таким как экаллантин, ингибитор С1-эстеразы (например, ЦИНРИЗ™), апротинин (ТРАСИ-ЛОЛ®) и/или ингибитор рецептора брадикинина В2 (например, икатибант (ФИРАЗИР®)).

Термин "комбинация" относится к использованию двух или более средств или терапий для лечения одного пациента, где использование или действие средств или терапий перекрываются во времени. Средства или терапии можно вводить одновременно (например, в виде одной композиции, вводимой пациенту, или в виде двух отдельных композиций, вводимых одновременно) или последовательно в любом порядке. Последовательные введения являются введениями, производимыми в разное время. Время между введением одного средства и другого средства может составлять минуты, часы, дни или недели. Антитело, связывающее калликреин плазмы, представленное в настоящем описании, также можно использовать для снижения дозы другого терапевтического средства, например, для снижения побочных эффектов, ассоциированных с другим вводимым средством. Таким образом, комбинация может включать введение второго средства в дозе, по меньшей мере на 10, 20, 30 или 50% ниже той, которую использовали бы в отсутствие антитела, связывающего калликреин плазмы. В некоторых вариантах осуществления субъект может получать С1-ингибитор в качестве нагрузочной IV дозы или SC дозы одновременно с первой дозой анти-pKcal антитела (например, DX-2930), как описано в настоящем изобретении. Субъект может затем продолжить лечение анти-pKcal антителом (без дополнительных доз С1-ингибитора).

Комбинированная терапия может включать введение средства, которое снижает побочные эффекты других терапий. Средство может быть средством, которое снижает побочные эффекты при лечении заболевания, связанного с калликреином плазмы, (iv) Анализы для оценки схемы лечения

Также в рамках настоящего раскрытия представлены методы анализа для оценки эффективности любого из способов лечения, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления концентрацию в плазме или сыворотке одного или более биомаркеров (например, 2-цепочечного НМВК), ассоциированных с НАЕ, можно измерить до и/или во время курса лечения (например, после начальной дозы) для оценки эффективности лечения. В некоторых вариантах осуществления концентрацию в плазме или сыворотке (уровень) одного или более биомаркеров, ассоциированных с НАЕ, полученную на момент времени после введения дозы, сравнивают с концентрацией биомаркера в образце, полученной в более ранний момент времени после введения дозы или до введения начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой 2-НМВК.

Уровень биомаркера можно измерить путем детекции биомаркера в образце плазмы или сыворотки, полученном от субъекта, например, при помощи иммуноанализа, такого как вестерн-блот-анализ или ELISA, с использованием антитела, которое специфически обнаруживает биомаркер. В некоторых вариантах осуществления уровень 2-НМВК в образце плазмы или сыворотки, полученном от субъекта, оценивают при помощи иммунологического анализа. Антитела для применения в иммунологических анализах для детекции 2-НМВК известны в данной области, и выбор такого антитела для использования в описанных в настоящем изобретении способах будет очевидным для специалиста в данной области.

Без дальнейшего уточнения, полагают, что специалист в данной области на основании представленного выше описания сможет использовать настоящее изобретение в полном объеме. Таким образом, следующие конкретные варианты осуществления следует истолковывать исключительно как иллюстративные, а не ограничивающие остальную часть раскрытия каким-либо образом. Все публикации, цитируемые в настоящем изобретении, включены в качестве ссылки для целей или объекта, описанных в настоящем изобретении.

Примеры

Пример 1. Двойное слепое исследование для оценки эффективности и безопасности DX-2930 с использованием многократных доз.

Общее описание исследования.

Описана фаза 3 многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования для оценки эффективности и безопасности DX-2930 в предотвращении острых приступов у пациентов с типом I и типом II НАЕ. Это двойное слепое исследование может сопровождаться после-

дующим периодом лечения. Как правило, включают субъектов в возрасте 12 лет и старше с документально подтвержденным диагнозом НАЕ типа I или типа II, которые испытывают по меньшей мере 1 приступ в течение 4 недель в течение вводного периода.

Долгосрочное профилактическое лечение (ЛТР).

Вымывание.

После информированного согласия субъектов подвергают скрининговым оценкам. Скринированные субъекты, которые проходят долгосрочную профилактическую терапию НАЕ, должны пройти минимальный 2-недельный период вымывания до начала вводного периода. Вымывание ЛТР разрешается, при условии, что исследователь определяет, что это не может привести к неоправданному риску, связанному с безопасностью для субъекта, и возраст субъекта по меньшей мере 18 лет. Эти критерии гарантируют, что пациенты, которые должны оставаться на ЛТР, не отчисляются из этого исследования, но позволяют включать соответствующих пациентов с тяжелыми заболеваниями, сводя к минимуму их время окончания ЛТР. Принципы современного лечения признают два разных стандарта подходов к лечению НАЕ, которые включают ЛТР и терапию по требованию (Cicardi et al., 2012; Craig et al., 2012; Zuraw et al., 2013). На протяжении всего исследования субъектам разрешено лечить острые приступы НАЕ. Таким образом, те субъекты, которые останавливают ЛТР с целью включения их в исследование, и которые впоследствии рандомизированы в группу плацебо, по-прежнему контролируются без снижения стандарта оказания медицинской помощи. Подтверждение того, что субъект успешно завершил 2-недельный период вымывания, требуется прежде, чем они смогут войти в вводный период.

Вводный период.

Скринированные субъекты, которые либо не проходят долгосрочную профилактическую терапию для НАЕ, либо завершили требуемый период вымывания, подвергаются вводному 4-недельному периоду для определения базовой частоты приступов НАЕ. Только субъекты, удовлетворяющие минимальной исходной частоте с по меньшей мере 1 подтвержденным приступом НАЕ за 4 недели, имеют право на зачисление в исследование и рандомизацию. Субъекты, испытывающие 3 или более подтвержденных приступа до конца 4-недельного периода, могут раньше выйти из вводного периода и перейти к регистрации и рандомизации. Субъекты, у которых не было, по меньшей мере 1 подтвержденного приступа после 4 недель вводного периода, могут продлить их вводный период еще на 4 недели, и в течение этого времени у них должно быть не менее 2 подтвержденных приступов, чтобы они могли быть зачислены в исследование и пройти рандомизацию.

Чтобы иметь право на зачисление, субъекты, у которых их вводный период был продлен, должны закончить полный 8-недельный вводный период до начала периода лечения. Субъекты, которые не удовлетворяют требованиям минимальной частоты приступов в вводном периоде, либо по иным причинам определены при скрининге как неподходящие для исследования, считаются как не прошедшие скрининг, и им не разрешается проходить повторный скрининг для зачисления в исследование.

Период лечения.

После проверки права на участие субъекты рандомизованно распределяют 2:1 для приема повторных подкожных (SC) введений DX-2930 или плацебо двойным слепым способом. Субъектам, которые рандомизированно распределены в группу DX-2930, распределяют в соотношении 1:1:1 для назначения одного из трех режимов дозирования: 300 мг каждые 2 недели, 300 мг каждые 4 недели или 150 мг каждые 4 недели. Рандомизацию во все группы лечения разбивают на блоки путем сравнения не прошедших лечение субъектов против подвергавшихся лечению субъектов (субъектов, получающих активный исследуемый препарат в протоколе DX-2930-02), а также базовой частоты приступов, наблюдаемой во время вводного периода, в следующие группы: от 1 до <2 приступов за 4 недели, от 2 до <3 приступов за 4 недели, и ≥3 приступов за 4 недели.

Каждый субъект проходит период лечения, состоящий из 13 доз замаскированного исследуемого лекарственного средства (ИМР), в течение 26 недель с даты первой дозы в день 0 до двух недель после последней дозы. Субъекты, рандомизированные в одну из 4 групп лечения, получают либо дозу DX-2930, либо дозу плацебо, в соответствии со схемой введения в табл. 2.

Схема введения в период лечения

Период лечения Группы по варианту лечения: DX-2930 или Плацебо					
Количество доз	Доза День/Неделя	300 мг каждые 2 недели	300 мг каждые 4 недели	150 мг каждые 4 недели	Плацебо
1	День 0/Неделя 0	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Плацебо
2	День 14/Неделя 2	DX-2930	Плацебо	Плацебо	Плацебо
3	День 28/Неделя 4	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Плацебо
4	День 42/Неделя 6	DX-2930	Плацебо	Плацебо	Плацебо
5	День 56/Неделя 8	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Плацебо
6	День 70/Неделя 10	DX-2930	Плацебо	Плацебо	Плацебо
7	День 84/Неделя 12	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Плацебо
8	День 98/Неделя 14	DX-2930	Плацебо	Плацебо	Плацебо
9	День 112/Неделя 16	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Плацебо
10	День 126/Неделя 18	DX-2930	Плацебо	Плацебо	Плацебо
11	День 140/Неделя 20	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Плацебо
12	День 154/Неделя 22	DX-2930	Плацебо	Плацебо	Плацебо
13	День 168/Неделя 24	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Плацебо
	День 182/Неделя 26	Нет дозы	Нет дозы	Нет дозы	Нет дозы

Описание лечения.

DX-2930.

DX-2930 представляет собой стерильный, без консервантов раствор для инъекций, pH 6,0. Активный ингредиент, DX-2930, сформулирован с использованием следующих фармакопейных компонентов: 30 мМ двухосновного дигидрата фосфата натрия, 19,6 мМ моногидрата лимонной кислоты, 50 мМ L-гистидина, 90 мМ хлорида натрия, 0,01% Полисорбата 80. Каждый сосуд содержит номинальную концентрацию 150 мг активного ингредиента DX-2930 в 1 мл раствора. Исследуемый препарат вводят путем подкожного введения в плечо слепым методом.

Для каждой дозы 300 мг DX-2930, каждый субъект получает всего 2 мл, разделенные на 2 отдельных SC инъекции по 1,0 мл DX-2930. 2 Инъекции делают в одно и то же плечо, с по меньшей мере 2 см между каждым местом инъекции. Для каждой дозы 150 мг DX-2930, каждый субъект получает всего 2 мл, разделенные на 2 отдельных подкожных инъекции по 1,0 мл, где одна инъекция представляет собой DX-2930, а другая представляет собой плацебо. 2 Инъекции делают в одно и то же плечо, с по меньшей мере 2 см между каждым местом инъекции.

Плацебо.

Плацебо состоит из неактивной композиции исследуемого продукта: 30 мМ двухосновного дигидрата фосфата натрия, 19,6 мМ моногидрата лимонной кислоты, 50 мМ L-гистидина, 90 мМ хлорида натрия, pH 6,0 с 0,01% Полисорбата 80. Дозы плацебо вводят пациентам, рандомизированным в группу лечения плацебо, и между дозами DX-2930 для субъектов, рандомизированных по 300 мг или 150 мг DX-2930 каждые 4 недели, в соответствии с схемой введения в табл. 1.

Для каждой дозы плацебо, каждый субъект получает всего 2 мл, разделенные на 2 отдельных подкожных инъекции по 1,0 мл плацебо. 2 инъекции делают в одно и то же плечо, с по меньшей мере 2 см между каждым местом инъекции.

Период наблюдения.

Субъекты могут дополнительно подвергаться оценкам безопасности и дополнительным оценкам (т.е. оценкам фармакокинетики и фармакодинамики) в течение 8-недельного периода наблюдения. Субъектов (или ухаживающих за пациентом) инструктируют, чтобы они информировали обо всех приступах НАЕ, которые они испытывали после последнего визита последующего наблюдения.

Правила прекращения участия в исследовании.

Если в любой момент времени определяется, что дозовая группа должна быть исключена из-за важного сигнала безопасности, оставшиеся не зачисленные в испытание субъекты могут быть повторно рандомизированы в оставшуюся группу(группы) введения более низких доз DX-2930 или плацебо и продолжить участие в исследовании двойным слепым образом. Данные для этих субъектов используют до

того момента, когда принято решение о снижении дозы в анализах эффективности и в целом в анализах безопасности.

Введение доз для любого отдельного субъекта прекращают, если субъект испытывает связанный с DX-2930 серьезный побочный эффект (или связанный с DX-2930 клинически значимый несерьезный побочный эффект), который, по оценке исследователя, оправдывает прекращение введения доз по сообщениям, связанным со здоровьем этого субъекта. У исследователя есть возможность связаться с медицинским наблюдателем и проконсультироваться с ним по таким вопросам. Субъекта отслеживают вплоть до завершения всех запланированных посещений, если только не поступит просьба о прекращении их участия в исследовании. Субъекты, которым прекратили дальнейшее введение, не будут иметь права участвовать в открытом расширенном исследовании (OLE).

Исследуемая категория пациентов.

В исследовании участвуют до 120 субъектов, чтобы обеспечить 108 прошедших полный курс субъектов. Субъекты имеют возраст 12 лет и старше и подтвержденный диагноз НАЕ (типа I или II), они должны испытывать по меньшей мере 1 подтвержденный приступ за 4 недели во время вводного периода. Целью является зачисление в исследование по мере мере 5 субъектов, которым от 12 до 17 лет. НАЕ диагноз подтверждается документированной клинической историей, согласующейся с НАЕ, и диагностическим тестированием, проведенным либо до, либо во время скринингового визита.

Критерии включения субъектов.

Пациенты, которые отвечают следующим критериям, подвергаются лечению, описанному в настоящем изобретении.

1. Мужчины и женщины 12 лет или старше на время скрининга.

2. Документированный диагноз НАЕ (тип I или II) на основании всех перечисленных ниже:

Документированная клиническая история, согласующаяся с НАЕ (эпизоды подкожных или слизистых незудящих отеков без сопутствующей крапивницы).

Результаты диагностического тестирования, полученные во время скрининга, которые подтверждают НАЕ типа I или II: функциональный уровень C1 ингибитора (C1-INH) < 40% от нормального уровня. Субъекты с функциональным C1-INH уровнем 40-50% от нормального уровня могут быть включены в исследование, если они также имеют C4 уровень ниже пределов нормы. Субъекты могут начать участвовать в вводном периоде до получения этих диагностических результатов. Субъектов можно подвергнуть повторному тестированию, если результаты не соответствуют истории болезни или если считают, что они искажаются недавно используемой ЛТР.

По меньшей мере одно из следующих: возраст на момент сообщения о появлении первых симптомов ангионевротического отека ≤ 30 лет, семейная история, подтверждающая НАЕ Типа I или II, или C1q в пределах нормы.

3. Имеют базовую частоту по меньшей мере 1 подтвержденный исследователем приступ НАЕ за 4 недели, как подтверждено во время вводного периода.

4. Взрослые субъекты и лица, ухаживающие за пациентами возраста меньше 18 лет, хотя и способны прочитать, понять и подписать форму информированного согласия. Субъекты в возрасте 12-17 лет, за которых дает информированное согласие лицо, ухаживающее за пациентом, хотя и способны прочитать, понять и подписать форму согласия.

5. Мужчины и женщины, которые являются фертильными и сексуально активными, должны соблюдать требования контрацепции на протяжении всего периода исследования следующим образом.

Женщины с детородным потенциалом должны согласиться на воздержание, или рекомендуется использовать высокоэффективные формы контрацепции с момента скрининга вплоть до 30 дней после заключительного визита исследования. Это включает только прогестиновые пероральные контрацептивы, связанные с ингибированием овуляции (пероральные, инъекционные или имплантируемые), внутриматочное устройство (IUD, всех типов) или системы внутриматочного высвобождения гормонов (IUS). Женщина, у которой у мужчины-партнера была вазэктомия, должна согласиться использовать еще одну форму приемлемой с медицинской точки зрения контрацепции. Использование мужского презерватива с или без спермицида или шеечного колпачка, диафрагмы или губки с спермицидом или комбинации (двухбарьерные методы) не считается высокоэффективным.

Женщинам без потенциала деторождения, определяемым как хирургически стерильные (статус после гистерэктомии, двусторонняя оофорэктомия или двусторонняя перевязка труб) или в период постменопаузы в течение по меньшей мере 12 месяцев не требуется контрацепция во время исследования.

Мужчины, в том числе мужчины, которые хирургически стерильны (после вазэктомии), с женщинами-партнерами с детородным потенциалом должны согласиться быть абстинентными или использовать приемлемую с медицинской точки зрения форму контрацепции с момента скрининга вплоть до 60 дней после заключительного визита исследования.

Критерии исключения субъектов.

Пациенты, имеющие один или более из следующих критериев, могут быть исключены из описанного в настоящем изобретении лечения.

1. Сопутствующий диагноз другой формы хронического, повторяющегося ангионевротического

отека, такого как приобретенный ангионевротический отек (ААЕ), НАЕ с нормальным С1-INH (также известный как НАЕ Типа III), идиопатический ангионевротический отек или повторяющийся ангионевротический отек, ассоциированный с крапивницей.

2. Прием исследуемого лекарственного средства или воздействие исследуемого изделия в течение 4 недель до скрининга.

3. Воздействие ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ) или любых эстроген-содержащих препаратов с системной абсорбцией (таких как пероральные контрацептивы или гормональная заместительная терапия) в течение 4 недель до скрининга.

4. Воздействие андрогенов (например, станозолола, даназола, оксандролон, метилтестостерона, тестостерона) в течение 2 недель до вступления в вводный период.

5. Применение длительной профилактической терапии НАЕ (С1-INH, аттенуированные андрогены или антифибринолитические средства) в течение 2 недель до вступления в вводный период.

6. Применение краткосрочной профилактики НАЕ в течение 7 дней до вступления в вводный период. Краткосрочная профилактика определяется как С1-INH, аттенуированные андрогены или антифибринолитические средства, используемые, чтобы избежать осложнений ангионевротического отека в результате показанных медицинских процедур.

7. Любое из следующих отклонений функциональной печеночной пробы: аланинаминотрансфераза (ALT) > 3x верхний предел нормы или аспарагинаминотрансфераза (AST) > 3x верхний предел нормы или общий билирубин > 2x верхний предел нормы (если только повышение билирубина не является результатом синдрома Жильбера).

8. Беременность или грудное вскармливание.

9. Субъект имеет какое-либо состояние, которое может считаться как негативно влияющее на безопасность или соблюдение режима лечения, препятствующее успешному проведению исследования или препятствующее интерпретации результатов (например, история злоупотребления психоактивными веществами или зависимости от них, серьезное перенесенное ранее заболевание или другая серьезная сопутствующая патология, которая, по мнению исследователя, может помешать интерпретации результатов исследования).

Первичные и вторичные конечные точки.

Следующие первичные и вторичные конечные точки эффективности оцениваются с дня 14 по день 182.

Первичной конечной точкой исследования является количество приступов НАЕ.

Вторичные конечные точки включают, в порядке значимости:

1. количество приступов НАЕ, требующих неотложного лечения;

2. количество умеренных до тяжелых приступов НАЕ.

Исследуемые конечные точки эффективности.

1. Время до первого приступа после дня 14, т.е. период, в течение которого у субъекта нет приступов после дня 14 до первого приступа.

2. Количество в неделю тяжелых приступов НАЕ; тяжелый приступ НАЕ определяется как любой приступ, который имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: тяжелый, приводящий к госпитализации (за исключением госпитализации для обследования < 24 ч), гемодинамически значимый (систолическое кровяное давление < 90, требует IV гидратации или ассоциирован с обморочным состоянием или состоянием близким к обмороку) или ларингеальный.

Клинические лабораторные исследования.

Субъекты, участвующие в клиническом исследовании, подвергаются лабораторным исследованиям, включающим общие параметры безопасности (гематология, коагуляция, исследование мочи и биохимический анализ сыворотки), серологию, тесты на беременность, С1-INH функциональный анализ, С4 анализ, С1q анализ, РК образцы, анализ антитела против лекарственного средства в плазме и PD образцы. Все лабораторные исследования осуществляют с использованием общепринятых и проверенных способов.

Пример 2. Открытое исследование для оценки эффективности и безопасности DX-2930.

Обзор исследования.

Описана фаза 3 многоцентрового рандомизированного открытого, расширенного исследования для оценки эффективности и безопасности DX-2930, исследуемого лекарственного средства (ИМР), в предотвращении острых приступов у пациентов с типом I и типом II НАЕ, которые имели предшествующее лечение НАЕ, включающее DX-2930. В этом исследовании в основном следуют предшествующей схеме лечения НАЕ, которая включала многократные дозы около 150 мг или 300 мг DX-2930 каждые четыре недели или 300 мг DX-2930 каждые две недели. Как правило, включают субъектов (пациенты, отобранные из предыдущей фазы исследования, например, которых лечили DX-2930, следуя схеме лечения, раскрытой в Примере 1, или пациенты, которых не отбирали из предыдущей фазы исследования, например, которых никогда не лечили DX-2930) возраста 12 лет и старше с документально подтвержденным диагнозом НАЕ Типа I или Типа II, и которые до лечения DX-2930 испытывали по меньшей мере 1 приступ за 4 недели во время вводного периода.

Субъекты для этого исследования возраста 12 лет и старше с подтвержденным диагнозом НАЕ (Тип I или II), которые испытывали по меньшей мере 1 приступ в 4 недели до предыдущего лечения НАЕ,

включающего DX-2930. Диагноз НАЕ подтвержден задокументированной историей болезни, подтверждающей НАЕ, и диагностическим тестированием, проведенным либо до, либо во время скринингового визита.

Период лечения (i).

Субъекты, отобранные из предыдущей фазы исследования.

Каждый субъект, отобранный из предыдущей фазы исследования (например, пациенты, которых лечили DX-2930, следуя схемам лечения, описанным в настоящем изобретении, например, в примере 1 выше), принимают одну немаскированную дозу 300 мг DX-2930, вводимую подкожно (SC) в день 0. Субъекты не будут принимать какие-либо дополнительные DX-2930 дозы вплоть до их первого сообщения, и это должно быть подтверждено исследователем, о приступе НАЕ. Период времени между первой немаскированной дозой и первым сообщением о приступе НАЕ варьируется между субъектами, отобранными из предыдущей фазы исследования. Пока субъект, отобранный из предыдущей фазы исследования, не сообщит о первом приступе НАЕ, субъект соблюдает схему визитов, где нужно осуществить следующие тесты и оценки: тест на беременность, клинические лабораторные исследования, физический осмотр, ЭКГ в 12 отведениях, QoL, PK, PD и сбор образцов для определения антитела против лекарственного средства.

Как только субъект, отобранный из предыдущей фазы исследования, сообщает его или ее первом приступе НАЕ, субъект посещает исследовательский центр для получения второй немаскированной дозы DX-2930 как можно быстрее, насколько это позволяет расписание работы центра. Во время визита, когда вводят вторую немаскированную дозу DX-2930, субъекта перед введением дозы проходит оценку жизненно важных функций, осуществляют физический осмотр, клинические лабораторные исследования и берут образцы крови на PK, PD и антитела против лекарственного средства. Показатели жизненно важных функций получают через 1 час после введения дозы.

Независимо от того, когда у субъекта, отобранного из предыдущей фазы исследования, случился первый приступ НАЕ, должно пройти минимум 10 дней между первой немаскированной дозой и второй немаскированной дозой. После второй дозы субъект, отобранный из предыдущей фазы исследования, продолжит прием повторных SC введений немаскированной дозы 300 мг DX-2930 каждые 2 недели в остальной период лечения в соответствии со схемой введения. Период лечения длится 350 дней от даты первой немаскированной дозы. Количество доз, введенных в течение этого периода, варьируется для разных субъектов в зависимости от даты введения второй дозы каждому субъекту, но не должно превышать 26 доз.

(ii) Субъекты, которые не были отобраны из предыдущей фазы исследования.

Как только все скрининговые оценки завершаются и завершается выбор субъектов, субъекты, которые не были отобраны из предыдущей фазы исследования, посещают исследовательский центр и, после преддозовых оценок, принимают немаскированную дозу 300 мг DX-2930, вводимую SC в день 0. Субъектам, которые не были отобраны из предыдущей фазы исследования, продолжают SC введения немаскированных доз 300 мг DX-2930 через каждые 2 недели на протяжении всего периода лечения в соответствии со схемой введения. В общей сложности вводят 26 доз, при этом последнюю дозу вводят при визите в день 350 исследования.

(iii) Все субъекты.

Все дозы (за исключением второй дозы для субъектов, отобранных из предыдущей фазы исследования) требуют минимум 10 дней и максимум 18 дней между введениями, и должны попадать в принятое окно ± 4 дня между предусмотренными исследованием визитами. Если субъект испытывает острый приступ ангионевротического отека в любое время в ходе исследования, который, по мнению исследователя, требует медицинского вмешательства, стандартное лечение должно быть обеспечено на основании истории болезни субъекта и в соответствии одобренной на местном уровне информации о препарате.

Введение DX-2930 и исследовательские процедуры продолжают без изменения расписания действий в соответствии с протоколом исследования, даже если субъект принимает лечение прорыва приступа ангионевротического отека в день запланированного введения дозы исследуемого лекарственного средства (в случае самостоятельного введения) или запланированного исследованием визита.

(iv) Продолжительность лечения.

Все субъекты принимают немаскированные дозы DX-2930 в течение 350-дневного периода лечения. Количество доз, которое принимают субъекты, отобранные из предыдущей фазы исследования, в течение этого периода, варьируется для разных субъектов, но не должно превышать 26 доз. Последнюю немаскированную дозу DX-2930 этим субъектам можно вводить в день 350 запланированного исследованием визита.

Субъекты, которые не были отобраны из предыдущей фазы исследования, принимают 300 мг DX-2930 каждые 2 недели, всего 26 доз, при этом первую дозу вводят в день 0, а последнюю дозу вводят в день 350 во время запланированного исследованием визита.

Существует окно ± 4 дня между запланированными исследованием визитами. Должно быть минимум 10 дней между любыми двумя дозами. За исключением интервала между первой и второй немаски-

рованными дозами для субъектов, отобранных из предыдущей фазы исследования, существует интервал максимум 18 дней между любыми двумя дозами. Субъектов контролируют в исследовательском центре в течение 1 часа после введения дозы во время каждого запланированного исследованием визита. Никакого контроля жизненноважных функций не осуществляют для субъектов, которые выбрали самостоятельное введение не в исследовательском центре.

Исследуемый препарат; доза; и способ введения.

DX-2930 (DX-2930) представляет собой стерильный, без консервантов раствор для инъекций, pH 6.0, Активный ингредиент, DX-2930, сформулирован с использованием следующих фармакопейных компонентов: 30 мМ двухосновного фосфата натрия дигидрата, 19,6 мМ лимонной кислоты (например, моногидрат лимонной кислоты), 50 мМ гистидина (например, L-гистидин), 90 мМ хлорида натрия, 0,01% Полисорбата 80. Каждый сосуд содержал номинальную концентрацию 150 мг активного ингредиента DX-2930 в 1 мл раствора. Исследуемый препарат вводят путем подкожного введения в плечо слепым методом.

Для каждой дозы 300 мг DX-2930, каждый субъект получает всего 2 мл, разделенные на 2 отдельных SC инъекции по 1,0 мл DX-2930. 2 Инъекции делают в одно и то же плечо, с по меньшей мере 2 см между каждым местом инъекции.

Для каждой дозы 150 мг DX-2930, каждый субъект получает всего 2 мл, разделенные на 2 отдельных подкожных инъекции по 1,0 мл, где одна инъекция представляет собой DX-2930, а другая представляет собой плацебо. 2 Инъекции делают в одно и то же плечо, с по меньшей мере 2 см между каждым местом инъекции.

DX-2930 можно вводить самостоятельно без наблюдения (родительский надзор требуется для подростковых субъектом) после того, как субъекты обучаются этому под руководством исследователя или назначенного лица, и подтверждается их умение делать это. Субъектам разрешается начинать самостоятельное введение после получения первых 2 доз DX-2930 в исследовательском центре, и они могут продолжить самостоятельно вводить все последующие дозы. См. также описания в настоящем изобретении.

Период наблюдения.

Субъектов подвергают оценкам безопасности и дополнительным оценкам (т.е. оценкам фармакокинетики и фармакодинамики) в течение 8-недельного периода наблюдения. Субъекты (или ухаживающие за пациентом) проинструктированы, что они должны проинформировать центр обо всех приступах НАЕ, которые они испытывали после последнего визита последующего наблюдения.

Правила прекращения участия в исследовании.

Если в любой момент времени будет определено, что доза имеет важный сигнал, касающийся безопасности, любая доза DX-2930 может быть уменьшена. Введение доз любому отдельному субъекту прекращают, если субъект испытывает связанный с DX-2930 серьезный побочный эффект (или связанный с DX-2930 клинически значимый несерьезный побочный эффект), который, по оценке исследователя, оправдывает прекращение введения доз по соображениям, связанным со здоровьем этого субъекта.

Критерии включения субъектов.

Пациенты, которые отвечают следующим критериям, подвергаются лечению, описанному в настоящем изобретении.

1. Мужчины и женщины 12 лет или старше на время скрининга.

2. Документально подтвержденный диагноз НАЕ (тип I или II) на основании всех перечисленных ниже.

Документированная клиническая история, согласующаяся с НАЕ (эпизоды подкожных или слизистых незудящих отеков без сопутствующей крапивницы).

Результаты диагностического тестирования, полученные во время скрининга, которые подтверждают НАЕ Типа I или II: Функциональный уровень C1 ингибитора (C1-INH) <40% от нормального уровня. Субъекты с функциональным C1-INH уровнем 40-50% от нормального уровня могут быть включены в исследование, если они также имеют C4 уровень ниже пределов нормы. Субъекты могут начать участвовать в вводном периоде до получения этих диагностических результатов. Субъектов можно подвергнуть повторному тестированию, если результаты не соответствуют истории болезни или если считают, что они искажаются недавно используемой LTP.

По меньшей мере одно из следующих: возраст на момент сообщения о появлении первых симптомов ангионевротического отека ≤ 30 лет, семейная история, подтверждающая НАЕ Типа I или II, или C1q в пределах нормы.

3. Имеют базовую частоту по меньшей мере 1 подтвержденный исследователем приступ НАЕ за 4 недели, как подтверждено во время вводного периода.

4. Взрослые субъекты и лица, ухаживающие за пациентами возраста меньше 18 лет, хотя и способны прочитать, понять и подписать форму информированного согласия. Субъекты в возрасте 12-17 лет, за которых дает информированное согласие лицо, ухаживающее за пациентом, хотя и способны прочитать, понять и подписать форму согласия.

5. Мужчины и женщины, которые являются фертильными и сексуально активными, должны соблюдать требования контрацепции на протяжении всего периода исследования следующим образом:

Женщины с детородным потенциалом должны согласиться на воздержание, или рекомендуется ис-

пользовать высокоэффективные формы контрацепции с момента скрининга вплоть до 30 дней после заключительного визита исследования. Это включает стабильные дозы, в течение 3 месяцев перед скринингом, комбинированной эстроген и прогестин-содержащей пероральной контрацепции, связанной с ингибированием овуляции (пероральной, инъекционной или имплантируемой), только прогестин-содержащей пероральной контрацепции, связанной с ингибированием овуляции, внутриматочное устройство (IUD, всех типов) или системы внутриматочного высвобождения гормонов (IUS). Женщина, у которой у мужчины-партнера была вазэктомия, должна согласиться использовать еще одну форму приемлемой с медицинской точки зрения контрацепции. Использование мужского презерватива с или без спермицида или шеечного колпачка, диафрагмы или губки с спермицидом или комбинации (двухбарьерные методы) не считается высокоэффективным.

Женщинам без потенциала деторождения, определяемым как хирургически стерильные (статус после гистерэктомии, двусторонняя оофорэктомия или двусторонняя перевязка труб) или в период постменопаузы в течение по меньшей мере 12 месяцев не требуется контрацепция во время исследования.

Мужчины, в том числе мужчины, которые хирургически стерильны (после вазэктомии), с женщинами-партнерами с детородным потенциалом должны согласиться быть абстинентными или использовать приемлемую с медицинской точки зрения форму контрацепции с момента скрининга вплоть до 60 дней после заключительного визита исследования.

Критерии исключения субъекта.

Пациенты, имеющие один или более из следующих критериев, могут быть исключены из описанного в настоящем изобретении лечения.

1. Сопутствующий диагноз другой формы хронического, повторяющегося ангионевротического отека, такого как приобретенный ангионевротический отек (ААЕ), НАЕ с нормальным С1-INH (также известный как НАЕ Тип III), идиопатический ангионевротический отек или повторяющийся ангионевротический отек, ассоциированный с крапивницей.

2. Прием исследуемого лекарственного средства (отличного от DX-2930 или других НАЕ терапий) или воздействие исследуемого изделия в течение 4 недели до скрининга.

3. Воздействие ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ) или любых эстроген-содержащих препаратов с системной абсорбцией (таких как пероральные контрацептивы или гормональная заместительная терапия) в течение 4 недели до скрининга.

4. Любое из следующих отклонений функциональной печеночной пробы: аланинаминотрансфераза (ALT) >3x верхний предел нормы, или аспарагинаминотрансфераза (AST) >3x верхний предел нормы, или общий билирубин >2x верхний предел нормы (если только повышение билирубина не является результатом синдрома Жильбера).

5. Беременность или грудное вскармливание.

6. Субъект имеет какое-либо состояние, которое может считаться как негативно влияющее на безопасность или соблюдение режима лечения, препятствующее успешному проведению исследования или препятствующее интерпретации результатов (например, история злоупотребления психоактивными веществами или зависимости от них, серьезное перенесенное ранее заболевание или другая серьезная сопутствующая патология, которая, по мнению исследователя, может помешать интерпретации результатов исследования).

Запрещенные сопутствующие лечения.

Использование следующих лечений будет запрещено во время исследования.

Длительная профилактика (LTP) НАЕ (например, использование С1-INH для длительной профилактики, аттенуированных андрогенов или антифибринолитических средств) после прерывания LTP (в течение 3 недель после первых доз DX-2930).

Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ).

Эстроген-содержащие препараты с системной абсорбцией (таких как пероральные контрацептивы или гормональная заместительная терапия).

Использование андрогенов (например, станозолола, даназола, оксандролон, метилтестостерона, тестостерона) для не связанных с НАЕ медицинских состояний или для НАЕ после прерывания в течение первых трех недель.

Любое другое исследуемое лекарственное средство или устройство.

Клинические лабораторные исследования.

Субъекты, участвующие в клиническом исследовании, подвергаются лабораторным исследованиям, включающим общие параметры безопасности (гематология, коагуляция, исследование мочи и биохимический анализ сыворотки), серологию, тесты на беременность, С1-INH функциональный анализ, С4 анализ, С1q анализ, РК образцы, PD образцы и анализ антител против лекарственного средства в плазме. Все лабораторные исследования осуществляют с использованием общепринятых и проверенных способов.

Самостоятельное введение.

Все субъекты (подростки или взрослые), которые считаются подходящими кандидатами (то есть те, кто обладает физическими и умственными способностями к обучению и стремлению к обучению), могут самостоятельно вводить лечение. Субъекты обучаются этому под руководством исследователя или на-

значенного лица, и исследователь или назначенное лицо подтверждает их понимание при обучении.

Субъектам разрешается начинать самостоятельное введение после получения первых 2 доз DX-2930 в исследовательском центре. После начала субъектам разрешается самостоятельно вводить последующие дозы DX-2930 в исследовательском центре (когда запланированы визиты в исследовательский центр) или дома у субъекта или в другом согласованном месте (когда исследование разрешает введение не в исследовательском центре). За подростковыми субъектами, самостоятельно вводящими исследуемый продукт, наблюдают родители/законный представитель/лицо, ухаживающее за пациентом. Альтернативно, родители/законный представитель/лицо, ухаживающее за пациентом, после завершения соответствующего обучения разрешает подростку вводить DX-2930 без контроля персоналом исследовательского центра. Персонал сайта обзванивает субъектов после запланированных самостоятельных введений вне исследовательского центра, чтобы убедиться, что введение осуществлено, собрать информацию о нежелательных событиях (АЕ), сопутствующих лечениях и убедиться, что все приступы надлежащим образом задокументированы.

Оценки эффективности.

Дополнительные критерии для конечных точек эффективности включали.

Время до первого приступа НАЕ у субъектов, отобранных из предыдущей фазы исследования, (на основании времени от первой немаскированной исследуемой дозы до первого приступа НАЕ).

Количество подтвержденных исследователем приступов НАЕ во время лечения.

Количество подтвержденных исследователем приступов НАЕ, требующих неотложного лечения в период лечения.

Количество умеренных до тяжелых приступов НАЕ в период лечения.

Количество тяжелых приступов НАЕ в период лечения; тяжелый приступ НАЕ определяется как любого приступ, который имеет по меньшей мере одно из следующих характеристик: тяжелый приступ НАЕ определяется как любой приступ, который имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: тяжелый, приводящий к госпитализации (за исключением госпитализации для обследования <24 ч), гемодинамически значимый (систолическое кровяное давление <90, требует IV гидратации или ассоциирован с обморочным состоянием или состоянием близким к обмороку) или ларингеальный.

Дополнительные исследования включали:

развитие антитела против лекарственного средства t,

фармакокинетику (PK),

фармакодинамические (PD) эффекты,

оценки качества жизни,

отчет об инъекциях DX-2930,

наблюдение за самостоятельным введением и подкожными инъекциями DX-2930.

Пример 3. Оценка НМВК после DX-2930 лечения.

НАЕ пациенты были рандомизированы в группы, получающие активное лекарственное средство (DX-2930), включающие группы с разными дозировками (30 мг, 100 мг, 300 мг и 400 мг), и группу, получающую плацебо, и вводили подкожные дозы плацебо или DX-2930 (DX-2930). Образцы плазмы собирали в точках времени от до получения дозы ("до приема препарата") и после введения в дни 8, 22, 50, 64, 92 и 120.

Образцы плазмы подвергали анализам биомаркеров для оценки фармакодинамической активности DX-2930 в плазме пациента. В частности, образцы оценивали на присутствие 2-цепочечного НМВК в анализе с использованием антитела, которое специфически связывается с 2-цепочечным НМВК.

Как показано на фиг. 3, введение DX-2930 приводило к снижению уровня 2-цепочечного НМВК у пациентов, которые принимали DX-2930, например, 300 мг или 400 мг DX-2930. Уровни 2-цепочечного НМВК у этих субъектов приближались к уровням 2-цепочечного НМВК, обнаруженным у здоровых субъектов, на 8 и 22 дни после введения и еще более снижались по меньшей мере к дню 92 после введения.

Эти результаты показывают, что введение DX-2930 снижало уровни 2-цепочечного НМВК (биомаркер для оценки нестабильности плазменного калликреина и стабилизирующего эффекта Dx-2930), что можно было определить в течение нескольких месяцев после введения. 2-цепочечный НМВК также используют в качестве биомаркера для оценки калликреина плазмы.

Другие варианты осуществления

Все признаки, раскрытые в настоящем описании, можно комбинировать в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в настоящем описании, можно заменять альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или схожей цели. Таким образом, если четко не указано иное, каждый раскрытый признак является исключительно примером из общей серии эквивалентных или схожих признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области легко сможет определить основные характеристики настоящего изобретения и, без отклонения от его сущности и объема, сможет осуществить различные изменения и модификации изобретения для его адаптации к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также входят в объем формулы изобретения.

Эквиваленты

Хотя в настоящем изобретении описано и проиллюстрировано несколько вариантов осуществления

изобретения, специалисты в данной области легко смогут вообразить множество других средств и/или структур для осуществления функции и/или получения результатов и/или одного или более преимуществ, описанных в настоящем изобретении, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считают входящим в объем вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных в настоящем изобретении. Более типично, специалистам в данной области будет понятно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, представленные в настоящем изобретении, являются иллюстративными, и что точные параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения, для которого используют руководство, описанное в настоящем изобретении. Специалистам в данной области будет понятно, или они будут способны выяснить с использованием не более чем рутинного экспериментирования, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем изобретении. Таким образом, следует понимать, что описанные выше варианты осуществления представлены исключительно в качестве примеров, и что в объеме формулы изобретения и эквивалентов варианты осуществления изобретения можно осуществлять на практике иным образом, чем конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к каждому отдельному признаку, системе, пункту, материалу, набору и/или способу, представленному в настоящем изобретении. Кроме того, в объем настоящего изобретения входит любая комбинация двух или более таких признаков, систем, пунктов, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, пункты, материалы, наборы и/или способы не противоречат друг другу.

Следует понимать, что все определения, как они представлены и используются в настоящем изобретении, имеют приоритет относительно определений, приведенных в словарях, определений в документах, включенных в качестве ссылок, и/или обычных значений определенных терминов.

В контексте изобретения термины в единственном числе, приведенные в описании и формуле изобретения, если четко не указано иное, следует понимать как включающие "по меньшей мере один".

В контексте изобретения фразу "и/или", приведенную в описании и формуле изобретения, следует понимать как означающую "любой или оба" из элементов, соединенных таким образом, т.е. элементов, в некоторых случаях присутствующих совместно, а в других случаях раздельно. Множество элементов, перечисляемых с "и/или", следует истолковывать тем же образом, т.е. "один или более" элементов, соединенных таким образом. Необязательно, могут присутствовать иные элементы, чем элементы, конкретно указанные с условием "и/или", относятся ли они, или нет, к тем конкретно определенным элементам. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на "А и/или В" при использовании в комбинации с неограниченными фразами, такими как "содержащий", может относиться в одном из вариантов осуществления только к А (необязательно, включая элементы, иные, чем В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно, включая элементы, иные, чем А); в еще одном варианте осуществления к А и В (необязательно, включая другие элементы) и т.д.

Следует понимать, что в контексте изобретения в описании и формуле изобретения "или" имеет то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне термины "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающие, т.е. включающие по меньшей мере один, но также включающие несколько из ряда или перечня элементов и, необязательно, дополнительные, не включенные в перечень пункты. Только термины, четко указывающие на иное, такие как "только один из" или "точно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению точно одного элемента из ряда или перечня элементов. В основном, в рамках изобретения термин "или" следует интерпретировать исключительно как указывающий на исключительные альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой", "один из", "только один из" или "точно один из", "состоящий по существу из" при использовании в формуле изобретения, должен иметь свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Следует понимать, что в рамках изобретения в описании и формуле изобретения фраза "по меньшей мере один", при ссылке на перечисляемые один или более элементов, означает по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в перечне элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно приведенного в перечне элементов, и не исключая какие-либо комбинации элементов из перечня элементов. Это определение также допускает, что, необязательно, могут присутствовать иные элементы, чем элементы, конкретно определенные в перечне элементов, к которому относится фраза "по меньшей мере", относится ли она, или нет, к этим конкретно определенным элементам. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, фраза "по меньшей мере один из А и В" (или эквивалентно "по меньшей мере один из А или В", или, эквивалентно "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном из вариантов осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая несколько, А в отсутствие В (и, необязательно, включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая несколько, В в отсутствие А (и, необязательно, включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно, включая несколько, А и по меньшей мере одному, необязательно включая несколько, В (и, необязательно, включая другие элементы); и т.д.

Также следует понимать, что, если четко не указано иное, в любых способах, заявленных в настоя-

шем изобретении, включающих несколько стадий или действий, порядок стадий или действий способа необязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа указаны.

В формуле изобретения, а также в представленном выше описании, все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий", "несущий", "имеющий", "состоящий из" и т.п., следует понимать как неограничивающие, т.е. означают "включая, но не ограничиваясь этим". Только переходные фразы "состоящий из" и "по существу, состоящий из" должны являться закрытыми или полузакрытыми переходными фразами, соответственно, как указано в United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения обострения наследственного ангионевротического отека (НАЕ) или снижения частоты приступов НАЕ, включающий:

(i) введение нуждающемуся в этом субъекту-человеку антитела в разовой дозе 300 мг, где указанный субъект-человек прошел первое лечение НАЕ, которое включает введение указанного антитела указанному субъекту в многократных дозах по 300 мг каждые две недели; и

(ii) дополнительное введение указанному субъекту-человеку антитела в одной или более дозах 300 мг, если субъект испытывает обострение НАЕ после (i),

где указанное антитело содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) с SEQ ID NO: 5, HC CDR2 с SEQ ID NO: 6, HC CDR3 с SEQ ID NO: 7 и CDR1 легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 8, LC CDR2 с SEQ ID NO: 9 и LC CDR3 с SEQ ID NO: 10;

где указанный субъект-человек имел по меньшей мере один приступ НАЕ за четыре недели до первого лечения НАЕ или по меньшей мере два приступа НАЕ за восемь недель до первого лечения НАЕ.

2. Способ по п.1, где на стадии (ii) субъекту вводят многократные дозы антитела 300 мг каждые две недели.

3. Способ по п.1 или 2, где первую дозу стадии (ii) вводят в течение одной недели после приступа НАЕ.

4. Способ по любому из пп.1-3, где разовую дозу (i) и первую дозу (ii) вводят с интервалом по меньшей мере 10 дней.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антитело включает последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 4.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антитело является полноразмерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

7. Способ по п.6, где антитело содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2.

8. Способ по любому предшествующих пунктов, где антитело сформулировано в фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель.

9. Способ по п.8, где фармацевтическая композиция включает фосфат натрия, лимонную кислоту, гистидин, хлорид натрия и полисорбат 80.

10. Способ по п.9, где фармацевтическая композиция содержит 30 мМ фосфата натрия, 19 мМ лимонной кислоты, 50 мМ гистидина, 90 мМ хлорида натрия и 0,01% полисорбата 80, pH 6.0.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антитело вводят подкожно.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный субъект-человек имеет НАЕ или у него подозревается НАЕ.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный субъект-человек имеет НАЕ I типа или II типа.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный субъект-человек испытал по меньшей мере два приступа НАЕ в год до первого лечения НАЕ.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный субъект-человек получил одно или более предшествующих лечений НАЕ до первого лечения НАЕ.

16. Способ по п.15, где предшествующее лечение НАЕ включает C1-ингибитор (C1-INH), ингибитор калликреина плазмы, антагонист рецептора брадикинина, андроген, антифибринолитическое средство или их комбинацию.

17. Способ по п.16, где предшествующее лечение НАЕ включает C1-INH, экаллантин, икатибант, даназол, транексамовую кислоту или их комбинацию.

18. Способ по любому из пп.15-17, где субъект прошел период постепенного снижения дозы во время одного или более предшествующих лечений НАЕ.

19. Способ по п.18, где период постепенного снижения дозы составляет 2-4 недели.

20. Способ по любому из пп.15-19, где одно или более предшествующих лечений НАЕ прекращается либо до введения первой дозы антитела в первом лечении НАЕ, либо в течение трех недель после первой дозы антитела в первом лечении НАЕ.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, где у указанного субъекта-человека не было

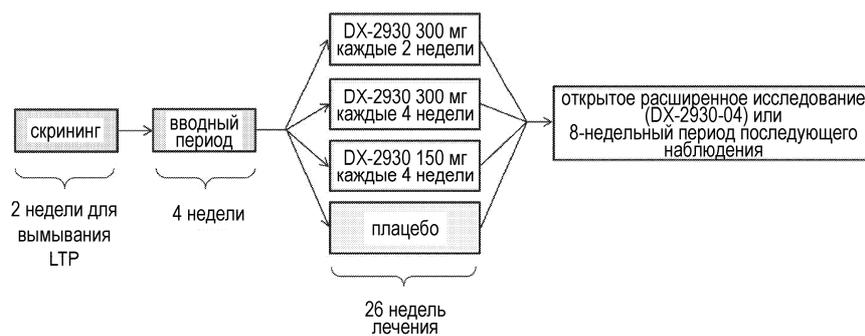
предшествующего лечения по меньшей мере за две недели до первого лечения НАЕ.

22. Способ по любому из предшествующих пунктов, где у указанного субъекта-человека не было длительной профилактики НАЕ или лечения НАЕ, включающего ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), эстрогенсодержащий препарат или андроген, до первого лечения НАЕ, во время первого лечения НАЕ и/или во время (i) и (ii).

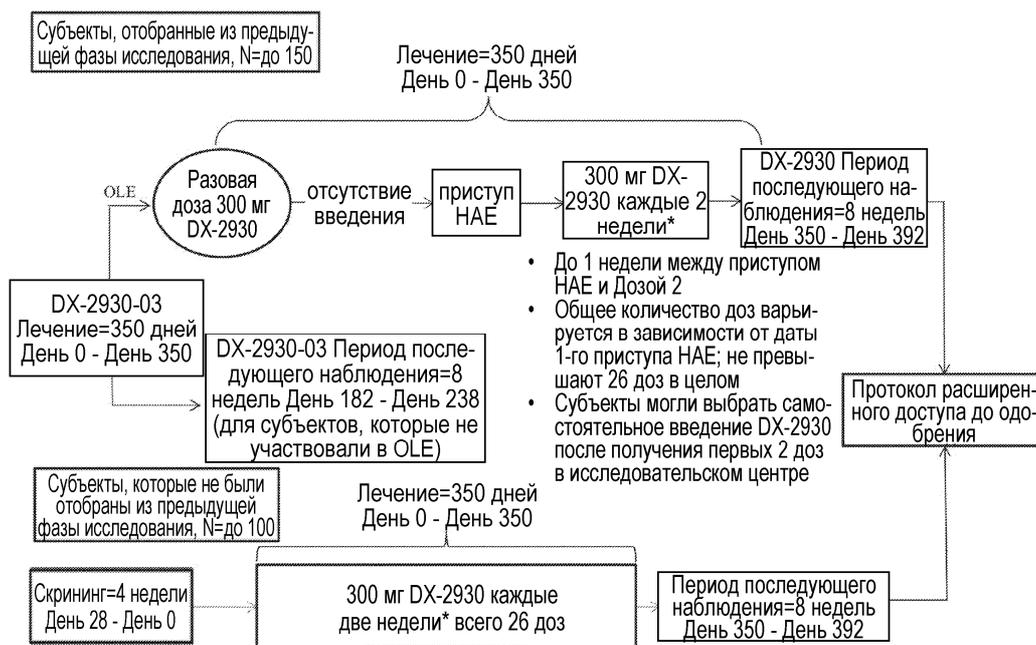
23. Фармацевтическая композиция, содержащая

300 мг антитела, где указанное антитело содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) с SEQ ID NO: 5, HC CDR2 с SEQ ID NO: 6, HC CDR3 с SEQ ID NO: 7 и CDR1 легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 8, LC CDR2 с SEQ ID NO: 9 и LC CDR3 с SEQ ID NO: 10, и

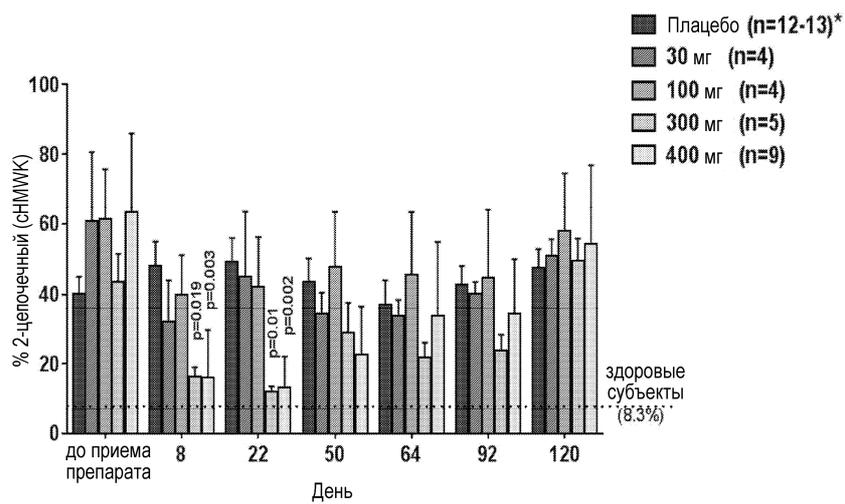
где указанная композиция содержит 30 мМ фосфата натрия, 19 мМ лимонной кислоты, 50 мМ гистидина, 90 мМ хлорида натрия и 0,01% полисорбата 80, pH 6.0.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2